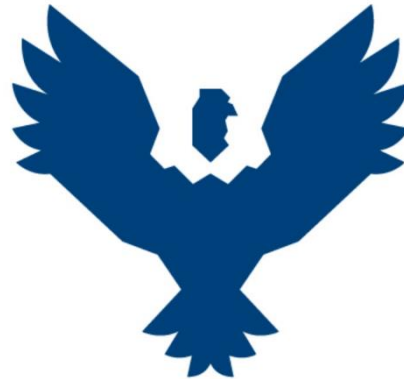




**Universidad Andina del Cusco**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Escuela Profesional de Psicología**



**Efecto de la adversidad en la infancia sobre los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2021**

**Tesis presentada por:**

**Bach. Eros Emanuel Alfaro Saca**  
**ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0510-2615>**

**Para optar el título profesional de:**  
**Psicólogo**

**Asesora:**  
**Dra. Grace Violeta Espinoza Pardo**  
**ORCID: [orcid.org/0000-0002-8840-3386](https://orcid.org/0000-0002-8840-3386)**

**Cusco 2022**



## Agradecimientos

En el ejercicio de la gratitud, agradezco a CONCYTEC-PROCIENCIA por haber financiado el presente trabajo, en el marco de la convocatoria E041-01 Contrato N°025-2019-FONDECYT-BM-INC.INV.

Así mismo, agradezco al Laboratorio de Investigación en Neurociencias de la Universidad Andina del Cusco por haberme brindado la oportunidad y el espacio para poder desarrollar la presente investigación.

Con gran admiración y respeto agradezco a la Dra. Grace E. Pardo, quien con paciencia, sabiduría y humildad me enseñó la importancia de realizar un trabajo bien hecho. Los saberes que usted compartió conmigo nunca los olvidaré.

Los resultados de esta investigación fueron publicados en Pardo GVE, **Alfaro Saca EE**, Becerra Flores CT, Delgados Casós WF, Pacheco-Otálora LF. *Limited bedding nesting paradigm alters maternal behavior and pup's early developmental milestones but did not induce anxiety- or depressive-like behavior in two different inbred mice*. Dev Psychobiol.2023 Jan;65(1):e22357. doi: 10.1002/dev.22357. PMID: 36567650.

Eros Alfaro



## Dedicatoria

Porque estos logros nunca son personales, dedico esta investigación a quien me enseñó un mundo más allá del mío. Sin tu compañía y tus palabras; sabes que no estaría aquí.

Porque asimilar lleva su propio ritmo y tiempo. Porque trabajar en silencio también necesita suavidad.

*Pueblos trabajadores*

*Infancias pobres*

*Cinco siglos igual*

*(León Gieco)*



## Índice

Capítulo 1: Introducción .....	13
Planteamiento del Problema .....	13
Formulación del Problema.....	19
Problema General .....	19
Problemas específicos.....	19
Justificación .....	19
Conveniencia .....	19
Relevancia social .....	20
Implicancia práctica.....	20
Valor teórico .....	21
Utilidad metodológica.....	21
Objetivos de investigación.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos .....	22
Delimitación del estudio .....	22
Delimitación espacial.....	22
Delimitación temporal .....	23
Viabilidad.....	23
Capítulo 2: Marco Teórico.....	24
Antecedentes del Estudio.....	24



Antecedentes internacionales.....	25
Bases Teóricas .....	33
Ansiedad .....	33
Depresión .....	38
Adversidad en la infancia .....	40
El rol de las experiencias tempranas en el neurodesarrollo psicoafectivo..	42
Adversidad en la vida temprana como factor de riesgo para la incidencia de trastornos depresivos.....	43
Interacción gen-ambiente en el desarrollo de trastornos ansiosos y depresivos .....	45
Modelo de trabajo con ratones.....	46
Dimensiones de Ansiedad en el modelo animal .....	47
Método para evaluar comportamientos de ansiedad en roedores .....	47
Dimensiones de la Depresión en los modelos animales .....	48
Método para evaluar comportamientos de depresión en roedores.....	49
Hipótesis de investigación .....	51
Hipótesis General.....	51
Hipótesis Específicas .....	51
Variable.....	51
Identificación de variables .....	51
Operacionalización de las variables.....	53
Definición de términos.....	56



Capítulo 3: Método .....	57
Alcances de la investigación.....	57
Diseño de la Investigación.....	57
Materiales y Metodología .....	60
Sujetos.....	60
Aspecto Ético.....	61
Paradigma de escasez/adversidad en la infancia.....	62
Evaluación de comportamientos de tipo ansiosos durante la adolescencia y aduldez.....	63
Eutanasia.....	71
Análisis de datos .....	71
Análisis Estadístico.....	72
Capítulo 4: Resultados de la investigación.....	73
Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso. ....	73
Campo Abierto.....	73
Laberinto Elevado en Cruz .....	79
Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo depresivo.....	84
Nado Forzado.....	84
Capítulo 5: Discusión.....	91
Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos .....	91
Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos .....	91



Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo ansioso .....	92
Efecto de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo depresivo.....	92
Discusión de los resultados más relevantes en comparación con la hipótesis .....	93
Comparación crítica con la literatura.....	94
Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos .....	94
Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo ansioso .....	95
Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo depresivos .....	96
Limitaciones del estudio .....	97
Recomendaciones .....	99
Implicancias del estudio.....	99
Conclusiones.....	101
Referencias bibliográficas.....	102
Instrumento de recolección de datos.....	119
Test de Nado Forzado .....	121
Anexos: .....	122



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Dimensiones de Ansiedad en el modelo animal</i> .....	47
<b>Tabla 2</b> <i>Dimensiones de la Depresión en los modelos animales</i> .....	49
<b>Tabla 3</b> <i>Operacionalización de variables</i> .....	53
<b>Tabla 4</b> <i>Operacionalización de variables controladas</i> .....	55
<b>Tabla 5</b> <i>Diagrama de diseño factorial 3 x 2 (tratamiento experimental x sexo x edad)</i> .....	59
<b>Tabla 6</b> <i>Diagrama de diseño factorial 3 x 2 (tratamiento experimental x cepa x edad)</i> .....	59
<b>Tabla 7</b> <i>Pruebas comportamentales</i> .....	69
<b>Tabla 8</b> <i>Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso, según el sexo, en la prueba de Campo Abierto en dos etapas de la vida.</i> .....	74
<b>Tabla 9</b> <i>Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso, según el sexo, en la prueba de Laberinto Elevado en Cruz en dos etapas de la vida</i> ....	80
<b>Tabla 10</b> <i>Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo depresivo, según el sexo, en la prueba de Nado Forzado en dos etapas de la vida.</i> .....	86





## Índice de Figuras

**Figura 1** *Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso, según la cepa, en la prueba de campo abierto en dos etapas de la vida.....71*

**Figura 2** *Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso, según la cepa, en la prueba de laberinto elevado en cruz en dos etapas de la vida .....81*

**Figura 3** *Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo depresivos, según la cepa, en la prueba de nado forzado en dos etapas de la vida.....87*



## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1</b> <i>Jaula Camada Grupo Experimental</i> .....	63
<b>Gráfico 2</b> <i>Línea temporal de experimentos</i> .....	71



## Resumen

La presente investigación usó el paradigma de restricción de material de cama y nido (RMN), con el fin de determinar de qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas. Esta investigación hizo uso de un diseño experimental puro de tipo factorial. Para ello se utilizaron 240 ratones en total (120 machos y 120 hembras) provenientes de veinticuatro camadas de las cepas C57BL/6NCrI y BALB/c distribuidos aleatoriamente en dos grupos llamados control ( $n=60$  por cepa y sexo) y experimental ( $n=60$  por cepa y sexo). Para medir los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos se usaron tres instrumentos: prueba de campo abierto, prueba de laberinto elevado en cruz y prueba de nado forzado. Para el análisis de datos se realizaron análisis estadísticos de tipo factorial ANOVA de dos vías considerando los factores protocolo (control y ELA) y sexo (macho y hembra) o cepa (C57BL/6NCrI y BALB/c), seguido del test *posthoc* de comparaciones múltiples de Tukey con el software GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, USA). Donde los resultados estadísticamente significativos fueron aquellos valores  $p<0,05$ . Los resultados mostraron que el impacto de la adversidad en la vida temprana, en forma de cuidados maternos fragmentados, afectó más a los ratones adolescentes y adultos machos y hembras de la cepa C57BL/6NCrI en comparación con los de la cepa BALB/c. Así mismo, se vio que el impacto de la exposición a la adversidad en la vida temprana fue diferente entre el periodo de la adolescencia y la adultez.

**Palabras clave:** paradigma de restricción de material de nido, adversidad en la infancia, cepas endogámicas, ansiedad, estrés, depresión.



## Abstract

This research used the Early Life Adversity model (ELA) by limiting the nesting and bedding material, in order to determine how ELA affects anxiety-like behavior and depressive-like behavior in young and adult mice of two strains. This research used a pure experimental design of factorial type. For this purpose, 240 mice were used in total (120 males and 120 females) from 24 litters of the C57BL/6NCrl and BALB/c strains randomly distributed in two groups called control (n=60 per strain and sex) and experimental (n=60 per strain and sex). Three instruments were used to measure anxiety-like behavior and depressive-like behavior: open field test, elevated plus maze and forced swimming test. For data analysis, two-way ANOVA factorial analyses were used for protocol factors (control and ALS) and sex (male and female) or strain (C57BL/6NCrl and BALB/c), followed by Tukey's posthoc multiple comparison test with GraphPad Prism 6.01 software (San Diego, CA, USA). Our results show that the impact of ELA, by maternal fragmented care, affected more young and adult males and females C57BL/6NCrl strain, compared to BALB/c strain. Likewise, it was seen that the impact to the exposure to ELA changes between the period of adolescence and adulthood.

**Key words:** Early Life Adversity, limited bedding model, mice strains, anxiety, depression.



## Capítulo 1: Introducción

### Planteamiento del Problema

La presente investigación tuvo por objetivo determinar de qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas. Para modelar la adversidad en la infancia, y sus efectos a largo plazo, son usados típicamente dos paradigmas traslacionales de experimentación: separación materna y el protocolo de restricción de material de nido (RMN); algunos trabajos también usan la combinación de ambos (Walker et al., 2018). Si bien ambos paradigmas tienen por objetivo alterar o interrumpir la relación madre-infante, ambos tienen consecuencias distintas en los comportamientos socioemocionales de las crías y se cree que esto es debido a un efecto directo del patrón del cuidado materno que se altera. La presente investigación hizo uso del paradigma de restricción de material de cama y nido, con ello buscó aportar la generación de modelos robustos del paradigma de adversidad en la infancia en ratones.

En los humanos la exposición a experiencias adversas en la vida temprana (ELA), como vivir en condición de pobreza, pérdida de uno de los padres, estar expuesto a negligencia emocional, abuso físico, eventos traumáticos o depresión materna, tiene consecuencias en la función cognitiva, afectando el desarrollo del lenguaje, memoria, atención y funciones ejecutivas. Además, los niños que experimentaron adversidad en la vida temprana tienen una tendencia a ser sociablemente distantes y con una predisposición a interactuar hostilmente con los otros, además de mostrar gran dificultad para reconocer expresiones faciales (Banqueri, Méndez, & Arias, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que el maltrato en la infancia, también denominado abuso y negligencia, incluye todas las formas de maltrato físico y



emocional, abuso sexual, negligencia y explotación que dan lugar a daño actual o potencial en la salud, desarrollo o dignidad del niño (Butchart y Harvey, 2009). Así pues, estas vivencias tienen riesgos importantes para el desarrollo de psicopatologías tales como trastornos de ansiedad y depresión (Kessler et al., 2010; McLaughlin et al., 2019), la mayoría de los cuales pueden emerger en la niñez y adolescencia (McLaughlin & Sheridan, 2016; Mills et al., 2019) y pueden persistir en la adultez (Clark et al., 2010; Green et al., 2010).

Los acontecimientos adversos en la infancia incluyendo el trauma, son una experiencia común a nivel global, y se estima que alrededor de una tercera parte de la población podría estar afectada (Kessler et al., 2010). Se ha estimado que alrededor del 16% de la población general ha sufrido alguna forma seria de maltrato, situándose la tasa de maltrato físico en alrededor del 7% y del maltrato emocional en el 6% (May-Chanal y Cawson, 2005). De modo general, la adversidad en la infancia constituye un factor de riesgo de psicopatología en la vida adulta (Norman et al., 2012)

De acuerdo con el informe “Niños y niñas en América Latina y el Caribe 2020. Panorama regional sobre la situación de la niñez en la región”, publicado por El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF); en América Latina y el Caribe (ALC), viven 188 millones de niñas, niños y adolescentes. De este grupo, 1.1 millones de niñas adolescentes de 15-19 años han experimentado violencia sexual o cualquier otro acto sexual forzado (incluyendo desde la infancia). El 63% de niños y niñas menores de 15 años experimentan algún tipo de disciplina violenta en el hogar (psicológica y física). Un 43% de niños y niñas menores de 15 años ha sido sometido a castigo corporal en el hogar. Alrededor del 46,2% de niños y niñas de 0-14 años viven en pobreza en América Latina. Estos niños y niñas viven en su mayoría en zonas rurales remotas y, cada vez más, en entornos periurbanos. Hallaron también que la tasa de homicidio adolescente es 5 veces



más alta en ALC que la media global: 24.500 adolescentes (10-19 años) son víctimas de homicidio. Al respecto se evidencia las brechas de desigualdad al acceso a servicios sociales y de protección donde todavía hay un número significativo de niños desfavorecidos y excluidos.

Volviendo la mirada sobre el Perú, el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) al 2021, señala que hay 8 millones 107,000 peruanos de 0 a 14 años. Sumados los peruanos de 15 a 17, se proyecta que hay más de 9 millones 650,000 niños, niñas y adolescentes en nuestro país. Este grupo poblacional comprende el 30% de la población peruana y es también el más susceptible a estar expuesto a situaciones de adversidad. Pues, conforme al reporte realizado por ENARES (2019), el 68,9% de la población de 9 a 11 años de edad sufrió violencia psicológica y/o física en el hogar alguna vez en su vida. Por tipo de violencia, el 38,6% de este grupo etario fue víctima de violencia física y psicológica a la vez, el 16,3% sufrió exclusivamente violencia psicológica y el 14,0% solo violencia física. Entre los años 2020 y 2021, los Centros de Emergencia Mujer (CEM) han registrado más de 43 mil casos de violencia contra niñas, niños y adolescentes (MIMP, 2022). Sumado a ello, según estimaciones del MINSA, Perú triplicó el número de niñas menores de diez años de edad forzadas a ser madres en el 2020 (Morales, 2021)

A esta problemática se advino las consecuencias de la pandemia del COVID-19, como el confinamiento prolongado que ha conducido a mayores niveles de violencia contra los menores cometidos por los propios cuidadores (Vadillo, 2021) y ha creado condiciones de riesgo para el deterioro de la salud mental tanto de los niños como de sus padres. Un reciente estudio epidemiológico del año 2021 realizado en el Perú por UNICEF reportó que un 77% de niños con 0- 1.4 años y un 68.3% con 1.5- 5 años que



viven con un cuidado con síntomas depresivos tienen riesgo de problemas de salud emocional o conductual (UNICEF, 2020).

Ahora bien, aunque los estudios epidemiológicos permiten correlacionar la exposición a adversidad en la infancia con el desarrollo de patologías, este tipo de estudios no permiten hacer inferencias de tipo causales sobre esas variables. Además, por razones éticas no se podrían hacer manipulaciones directas sobre el ambiente temprano de los infantes humanos. Sumado a esto, existen variables que son difícil de controlar, como por ejemplo las predisposiciones genéticas individuales. Por este motivo, para testar hipótesis causales en torno a los efectos de la exposición a adversidad en la infancia y sus influencias posteriores en el desarrollo de psicopatologías, se necesita recurrir a modelos animales en los cuales se pueden controlar tanto los factores ambientales como las predisposiciones genéticas.

Para realizar estudios preclínicos de identificación y comprensión de factores genéticos y ambientales o la interacción de ambos involucrados en el desarrollo de psicopatologías, es crucial contar con modelos animales válidos y robustos que permitan reproducir los hallazgos neuro comportamentales, minimizar los falsos positivos y permitan la prueba de hipótesis traslacionales y el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y de drogas terapéuticas (Anderzhanova et al., 2017; Nestler & Hyman, 2010). Para este tipo de abordaje, los modelos desarrollados en roedores, especialmente ratones, son los más comunes. En la actualidad, se considera a la restricción de material de nido/cama (RMN) en ratón como un modelo robusto y con potencial traslacional para representar los efectos a largo plazo de la adversidad en la infancia.

En roedores, la exposición a una jaula con recursos limitados de cama/nido (RMN) durante los días postnatal (DPN) 2-9 puede producir efectos duraderos en el





comportamiento emocional y la reactividad a estresores, conjuntamente con alteraciones en la funcionalidad de sistemas cerebrales implicados en la emocionalidad (Molet, Maras, Avishai-Eliner, & Baram, 2014). Este modelo de escasez induce estrés en la madre ratones y altera su comportamiento materno (Baram et al., 2013; Ivy et al., 2008), el cual se fragmenta y se torna impredecible para el infante (Bolton et al., 2017; Rice et al., 2008) aunque la cualidad general del cuidado maternal se mantenga sin muchos cambios (Bolton et al., 2017; Gallo et al., 2019; Ivy et al., 2008; Rice et al., 2008). Este comportamiento materno fragmentado se presume que provoca cambios crónicos, de estrés emocional impredecible e incontrolable en las crías infantiles (Glynn & Baram, 2019). El efecto de este estrés emocional en las crías sería un efecto directo de la fragmentación de cuidado materno sobre el sistema de regulación de respuesta al estrés de las crías. Durante la exposición a este protocolo, un incremento persistente en los niveles plasmáticos de la hormona corticosterona y también de hipertrofia de la glándula adrenal son reportados en las crías (Brunson et al., 2005; Ivy et al., 2008). Estos cambios desaparecen tan pronto la madre y sus crías son retornadas a sus jaulas estándares en el DPN 10 (Brunson et al., 2005; Ivy et al., 2008). Aun así, la experiencia de exposición al protocolo RMN durante períodos tempranos del desarrollo resulta en consecuencias duraderas en la función emocional y cognitiva de la prole (Baram et al., 2013; Bolton et al., 2017).

De acuerdo con Anda (2006) un único factor estresante significativo durante la infancia puede aumentar en un 30%, aproximadamente, el riesgo de patología en la adultez. Para entender más a fondo el impacto de exposición a adversidad en la infancia en el desarrollo de psicopatologías en la vida adulta se ha sacado provecho de las diferencias genéticas existentes entre cepas de ratones consanguíneas, los cuales proveen una variabilidad genética y diferencias fenotípicas naturales (Anda et al., 2006). Por



ejemplo, los ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c difieren en su susceptibilidad al estrés, siendo que la cepa BALB/c es considerada innatamente ansiosa que los de la cepa C57BL/6 (Anisman et al., 2001; Brinks et al., 2007; Dulawa et al., 2004; Kopp et al., 1999). Sin embargo, la exposición de estas cepas a un protocolo de separación materna en la infancia, considerado un estresor en la vida temprana, no produce alteraciones claras en los comportamientos tipo ansiosos o depresivos (Rachel A. Millstein & Holmes, 2007) aunque este modelo impacta de manera cepa específica en funciones cognitivas, como la memoria, aprendizaje y la atención (Mehta & Schmauss, 2011). Estas diferencias en la susceptibilidad y respuesta al estrés de estas dos cepas sugieren también que pueden mostrar diferencias en su vulnerabilidad a los efectos de la exposición a adversidad en la infancia como el protocolo de RMN. Se esperaba que la exposición al protocolo RMN durante la infancia tuviese un mayor impacto en aquella cepa de ratones con mayor vulnerabilidad para estresores. Los resultados sirvieron para considerar un modelo apropiado de roedor que permita explorar hipótesis causales a diferentes niveles de análisis en torno a los efectos neuro comportamentales de exposición a adversidad en la infancia, permitiendo la identificación de períodos sensibles para el desarrollo de vulnerabilidad, con potencial para integrar preguntas traslacionales y de búsqueda de estrategias terapéuticas.

Por otro lado, también la susceptibilidad a los efectos de la adversidad en infancia podría ser dependiente del sexo. Las mujeres tienen un mayor riesgo de desarrollar trastornos psicológicos asociados al estrés con una relación de riesgo mujer/hombre aproximadamente de 2 a 1 (Kessler, 2006). Por lo tanto, se propuso determinar si los efectos de la exposición al modelo RMN durante la infancia en los comportamientos tipo ansioso y depresivo variaba con la cepa (C57BL/6NCrI y BALB/c) y el sexo. Además,



se propuso determinar si este efecto pudiese ser identificado en el período adolescente y persistir en el periodo adulto.

## **Formulación del Problema**

### ***Problema General***

¿De qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas?

### ***Problemas específicos***

¿En qué medida el impacto de la adversidad en la infancia influye sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones de acuerdo con el genotipo?

¿En qué manera el impacto de la adversidad en la infancia repercute en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones según el período del desarrollo?

¿En qué medida el impacto de la adversidad en la infancia incide sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones conforme al sexo?

## **Justificación**

### ***Conveniencia***

Esta investigación, haciendo uso de un modelo animal, nos permitió explorar de manera controlada, preguntas sobre los factores de genotipo, edad y sexo que contribuyen al apareamiento de alteraciones de la función emocional de individuos expuestos a adversidad en la infancia. El modelo experimental animal de adversidad que usamos se caracteriza por limitar la cantidad de material de cama/nido para anidar de la madre roedor, esta condición fragmenta el patrón natural de cuidado materno, el cual tiene impacto en el desarrollo global del infante. Este abordaje experimental intenta modelar



un entorno adverso de los infantes humanos, que viven en familias con carencias materiales, situación que puede significar estrés psicosocial para los principales cuidadores o la madre del infante. Esto puede afectar el estilo de crianza de la madre o los cuidadores, como por ejemplo reducir la sensibilidad a las demandas y necesidades de los infantes, incrementar un trato negligente o, en el peor de los casos, infringir estrategias de crianza abusivas o de maltrato. Bajo esta perspectiva, este modelo tiene un potencial para explorar preguntas mecanísticas que no pueden ser abordadas en humanos.

### ***Relevancia social***

El uso de un modelo experimental animal con potencial traslacional permite abordar interrogantes sobre cómo afecta la adversidad en la vida temprana en los humanos con factores que se asocian a este, como la escasez de recursos, maltrato infantil, abandono y carencia de figuras paternas. Tener evidencias científicas sobre los efectos de la adversidad puede dar luces para entender aspectos claves del desarrollo psicoafectivo y social en humanos, de modo que puedan tener implicancias prácticas para las políticas públicas orientadas a la infancia y la niñez. En ése sentido, pensamos que los resultados de este trabajo pueden contribuir a incrementar la mirada hacia la primera infancia con énfasis principalmente en la valoración de esta etapa del desarrollo como de gran vulnerabilidad a las experiencias adversas provocadas por un entorno ambiental de escasez y de desigualdad social.

### ***Implicancia práctica***

Esta investigación, haciendo uso de un modelo experimental animal de adversidad en la infancia, permitió determinar la sensibilidad de un fenotipo animal sobre el otro para el impacto en la emocionalidad. Los resultados de esta investigación sugieren que, aunque ambas cepas de ratones sometidos a una condición de adversidad en la infancia



muestran una reducción de comportamientos semejantes a la ansiedad y depresión, los ratones de la cepa BALB/c son los que muestran un perfil mejorado en estas respuestas. Este hallazgo puede tener implicancias prácticas para el uso en investigación básica experimental de este fenotipo como un potencial modelo de resiliencia y explorar preguntas en torno a los mecanismos neurobiológicos que lo subyacen.

### ***Valor teórico***

El desarrollo de la investigación permitió entender si las experiencias adversas en la infancia interactúan con las variaciones genéticas individuales y contribuyen con el desarrollo de susceptibilidad o resiliencia a estresores en la vida adulta. Además, los resultados de esta investigación permitieron explorar los efectos del estrés en la vida temprana a un acercamiento de los mecanismos que afectan al desarrollo de trastornos depresivos y ansiosos siendo causal a la forma y condiciones de crianza, lo cual significa generar conocimiento útil en áreas como el desarrollo psicoafectivo, apego y etiopatogenia.

### ***Utilidad metodológica***

Esta investigación buscó validar el modelo traslacional de adversidad en la infancia (ELA) en dos cepas ratones a través de la restricción de material de cama y nido. Si bien el protocolo ELA es ampliamente utilizado en ratas y ratones para explorar preguntas en torno a los efectos de corto y largo plazo en el desarrollo, su replicabilidad parece depender del tipo de cepa, laboratorio y métodos de evaluación utilizados. De modo que, cuando un laboratorio buscar utilizar un modelo animal de un fenómeno específico como es la adversidad en la vida temprana, tiene que estandarizar el modelo para las condiciones propias de laboratorio (cepas, equipos, horarios, investigadores), manteniendo todos los demás parámetros controlados y compararlas con los principales



resultados ya descritos en la literatura por otros laboratorios. En ése sentido, los resultados de esta investigación son de utilidad metodológica al contribuir con evidencia de que los dos tipos de cepas de ratones utilizados, ambas cepas procedentes del Bioterio de la UAC, no sugieren ser un buen modelo para estudiar los efectos a largo plazo de la adversidad en la infancia en la depresión

## **Objetivos de investigación**

### ***Objetivo General***

Determinar de qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas.

### ***Objetivos Específicos***

Analizar en qué medida el impacto de la adversidad en la infancia influye sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones de acuerdo con el genotipo.

Explicar de qué manera el impacto de la adversidad en la infancia repercute en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones según el período del desarrollo.

Comparar en qué medida el impacto de la adversidad en la infancia incide sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratone conforme al sexo.

## **Delimitación del estudio**

### ***Delimitación espacial***



La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Andina del Cusco ubicada en la C.C. Ccollana, en el distrito de San Jerónimo, en la provincia de Cusco, en Perú.

### ***Delimitación temporal***

La presente investigación fue desarrollada a lo largo de 6 meses, de septiembre de 2021 a mayo de 2022.

### ***Viabilidad***

La presente tesis se ejecutó como parte del proyecto macro Incorporación de Investigadores Fondecyt-Banco Mundial (Proyecto 025-2019-F-BM), por lo que contó con la infraestructura, fondos y recursos humanos necesarios para el desarrollo de la investigación. Así mismo, contó con la aprobación del Comité de Ética de estudio con animales de la Universidad Andina del Cusco (Protocolo #2019-001-IACUC-1).



## Capítulo 2: Marco Teórico

En esta sección se presenta la base teórica que dan soporte a la hipótesis y objetivos de la investigación.

### **Antecedentes del Estudio**

La necesidad de entender la etiología de depresión y, principalmente, cómo los factores ambientales adversos durante las primeras etapas tempranas del desarrollo moldean los circuitos neuronales relacionados y comportamientos afectivos emocionales que resultan en trastornos la vida adulta, hace necesario el uso de un abordaje experimental, la misma que permita modelar la adversidad, desde una perspectiva reduccionista, y explorar sus relaciones causales con los comportamientos emocionales en los períodos posteriores del desarrollo de los individuos. Para este propósito, si bien dentro de la historia de la psicología se han hecho uso de primates no humanos para la exploración de cómo la adversidad asociada con la alteración o ausencia del cuidado materno tiene consecuencias dramáticas sobre el comportamiento del infante (por ejemplo los experimentos seminales de separación maternal con macacos de Harry Harlow), el uso de modelos desarrollado en roedores ha contribuido bastante para dilucidar aspectos relacionados a la temporalidad de los estímulos adversos, circuitos neuronales sensibles, alteraciones cognitivas y emocionales, entre otros. A continuación, se discuten los principales estudios realizados en el campo usando modelo de adversidad en la infancia en roedores y su impacto a largo plazo en los comportamientos tipo depresivo y ansioso.

Para modelar las adversidades en la infancia en roedores y sus efectos a largo plazo, son usados típicamente dos paradigmas: separación materna y restricción de material de cama/nido (RMN), y algunos trabajos también usan la combinación de ambos





(Walker et al., 2018). Si bien ambos paradigmas tienen por objetivo alterar o interrumpir la relación madre-infante, ambos tienen consecuencias distintas en los comportamientos socioemocionales de las crías y se cree que esto es debido a un efecto directo del patrón del cuidado materno que se altera. En los protocolos de separación materna, la madre es privada de sus crías durante 15 min, 1 ó 3 horas, durante este período de separación las crías permanecen en un ambiente a temperatura controlada (Millstein et al., 2006). Cuando la madre es retornada a su nido, incrementa su frecuencia de comportamiento de lambida de las crías, lo cual se ha asociado con los efectos que observan en el período adulto de las crías, como son los bajos de niveles de ansiedad, reducción de comportamientos de riesgo, etc. (Alves et al., 2020). Por otro lado, el modelo de restricción de material de cama y nido se ha propuesto como un modelo de adversidad en la infancia mediante la alteración del patrón de cuidado materno (Molet et al., 2014). La madre al tener escaso material para anidar realiza muchos comportamientos de salida del nido para buscar material para anidar y construir su nido, estos comportamientos ocurren en detrimento de otros comportamientos del repertorio de la madre como son el amamantar, lamer y permanecer dentro del nido prodigando calor a las crías.

Ambos paradigmas son vigentes y el paradigma RMN es considerado un modelo naturalista en función a que el ambiente de las camadas no es interrumpido como ocurre en el modelo de separación materna en ratones. En este estudio, moldeamos la adversidad en la infancia usando el paradigma RMN.

### ***Antecedentes internacionales***

El primer estudio usando el paradigma RMN usando ratones fue realizado por Rice et al. en el año 2008, titulado “*A Novel Mouse Model for Acute and Long-Lasting Consequences of Early Life Stress*”. En este estudio encontraron que la exposición de



camadas de ratones de la cepa C57BL/6J al protocolo RMN durante el período DPN 2-9 resultó en un incremento significativo en el número de salidas de la madre del nido en relación con sus controles, aunque sin cambios en el número de las interacciones madre-infante. Asimismo, mostraron una relación directamente proporcional entre la cantidad de material de nido proporcionado con el incremento del número de salidas de la madre del nido, siendo considerado por los autores 1/3 de material de nido (algodón 5 x 5 cm de tamaño) como un predictor de un alto número de salida del nido de la madre y un nivel elevado de la hormona del estrés (corticosterona plasmática), acompañado de una reducción de los receptores del factor liberador de corticotropina en el núcleo paraventricular del hipotálamo y reducción importante de la ganancia de peso corporal de las crías al término de la exposición al protocolo RMN. Asimismo, mostraron que los cambios en el sistema de respuesta del estrés eran capaces de perdurar en el período adulto de las crías, aunque sin cambios en el peso corporal. Por otro lado, los autores también encontraron que la exposición al protocolo RMN en la vida temprana es capaz de inducir alteraciones a largo plazo en los procesos cognitivos de las crías. Las crías adultas expuestas a pruebas de aprendizaje y memoria mediante el test acuático de Morris demoran más tiempo para encontrar la plataforma de escape. Si bien, los animales expuestos a adversidad en la infancia mostraban un déficit en la capacidad de memoria espacial dependiente de hipocampo, los autores no encontraron alteraciones en la memoria de reconocimiento de objetos como tampoco alteraciones en niveles de ansiedad, esto inferido a partir de evaluación en la prueba de campo abierto. La conclusión de este estudio es que la manipulación del ambiente inmediato de la camada, su jaula, mediante la reducción del material de nido y de cama conlleva a la fragmentación de la interacción entre las crías y la madre lo cual provoca alteraciones en el sistema de respuesta al estrés de las crías y también induce alteraciones en los procesos de memoria



y aprendizaje (Rice, Sandman, Lenjavi, & T, 2008). Este es el primer trabajo de la literatura realizado en ratones que muestra el protocolo RMN en los cambios inmediatos y a largo plazo en las crías.

Si bien, el trabajo de Rice et al 2008 muestra que el protocolo RMN provoca alteraciones importantes en el cuidado materno, como el incremento de la salida del nido, y que este cambio está directamente relacionado con la reducción de material de nido y esta, a su vez, con un incremento en la secreción de la hormona corticosterona (la hormona del estrés), otro estudio muestra que ciertos repertorios comportamentales de la madre aparecen durante la exposición al protocolo RMN y que este puede ser nocivo para el infante.

En el año 2019 Gallo, et al. realizaron la investigación titulada *“Limites Bedding and Nesting Induces Maternal Behavior Resembling Both Hypervigilance and Abuse”*. En esta investigación midieron los efectos comportamentales del protocolo de restricción de material de nido (RMN) en ratones C57BL/6, utilizando monitoreo continuo a través de vídeo grabación. Lo que les permitió expandir la ventana de observación para incluir el ciclo circadiano completo de todos los días de manipulación. Así pues, lograron identificar nuevos efectos de RMN en las interacciones madre-crías, como la fragmentación de comportamientos de cuidado en madres RMN impulsando una forma de crianza hipervigilante estresada asociada con la restricción de recursos. Identificaron también un subconjunto de madres que mostraban comportamientos tipo abusivo por medio de patadas, y resultados diferenciales en crías criadas en condiciones de RMN sin agresión materna en comparación con las criadas en agresión materna. Además, lograron identificar efectos significativos del ciclo circadiano y del día en varios comportamientos, demostrando que los efectos de la RMN en el comportamiento materno no son uniformes a lo largo del día o la manipulación. Los autores enfatizan que el ciclo circadiano y del



día deben tenerse en cuenta al evaluar los biomarcadores de riesgo/resiliencia en los modelos de restricción de recursos. Por otro lado, demostraron que las crías expuestas a RMN más agresión materna mostraron diferencias en pruebas aplicadas en la edad adulta (CA, LCE y CCO), mostrando lo que parece ser un comportamiento tipo impulsivo de riesgo y una mayor locomoción, mientras que las crías RMN tienden a una evaluación de riesgo elevada. En cuanto a los resultados, los investigadores no hallaron efectos significativos en el tiempo de latencia en el centro de la arena en la prueba de campo abierto, pero sí mayor espacio recorrido, en especial los ratones RMN víctimas de agresiones. Así como tampoco encontraron efectos significativos de acuerdo al grupo respecto al tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto de cero elevado, ni en la distancia recorrida en el mismo. El resultado más significativo se ve en la latencia de entrada a la caja oscura en la evaluación de caja clara/oscura, donde los ratones sometidos al protocolo tienden a pasar menos tiempo en la caja clara en comparación con los controles. Por lo tanto, concluyen que los comportamientos de tipo abusivo en el paradigma RMN pueden alterar el desarrollo, aunque para entender las implicaciones diferenciales de la restricción de recursos (RMN) y las interacciones abusivas (RMN + abuso) en el desarrollo neuronal y conductual, y la reactividad del estrés se necesitarían más investigaciones futuras (Gallo et al., 2019).

Como vimos, el trabajo de Gallo et al demostró que el protocolo RMN más una serie de agresiones por parte de las madres induce a que los ratones presenten comportamientos tipo impulsivo de riesgo en la edad adulta. Por otro lado, otro estudio muestra que los fenotipos depresivos emergentes de desarrollo que se generaron en la adolescencia temprana tienden a hacerse más robustos en la edad adulta.

Así, en 2019 Goodwill et al. ejecutaron la investigación titulada “*Early life stress lead to sex differences in depletion of depressive-like outcome in a mouse model*”. En la



cual probaron si el estrés en la vida temprana (RMN) en forma de atención materna fragmentada, inducida por restricción de cama y nido (DPN 4 – DPN 11) induce a comportamientos de tipo depresivo o ansioso según el sexo en ratones C57BL/6N. Para probar si el protocolo contribuye al desarrollo de comportamientos tipo depresivo, los ratones fueron sometidos a las pruebas de preferencia de sacarosa, natación forzada, campo abierto, laberinto elevado en cruz y prueba de hipofagia inducida por novedad. Acompañado a estas evaluaciones sumaron la monitorización por vídeo grabación de los ratones. Los resultados a los que llegaron indican que el RMN en forma de cama limitada condujo a un fenotipo depresivo emergente de desarrollo que estaba presente durante la adolescencia temprana y se hizo más robusto en la edad adulta. Notaron también por medio del monitoreo continuo por vídeo grabación comportamientos adicionales, discretos y depresivos en hembras expuestas al RMN, sugiriendo que las hembras tienden a mostrar comportamientos tipo depresivo en comparación a los machos. Finalmente concluyen que si bien hay evidencia de que diferentes tipos de eventos estresantes tempranos son más propensos a resultar en un trastorno sobre el otro, la separación de los padres se asocia a ambos trastornos por igual, pero la reducción del cuidado de los padres y el abuso infantil son más frecuentes en casos de trastorno depresivo mayor (Goodwill et al., 2019).

Aun cuando los fenotipos depresivos emergentes persisten y se hacen más robustos en la etapa del desarrollo, otros estudios muestran que los fenotipos tipo ansioso y depresivo varían según el sexo del animal, siendo las hembras quienes tienden a presentar estos fenotipos en mayor medida que los machos.

En 2020 Demaestri et al. llevaron a cabo la investigación “*Type of early life adversity confers differential, sex-dependent effects on early maturational milestones in mice*”. En esta investigación compararon dos modelos para inducir adversidad en la vida



temprana del DPN 4-11: separación materna (SM) y restricción de material de cama y nido (RMN) en ratones de la cepa C57BL/6N machos y hembras, donde observaron el desarrollo corporal, hitos motores y visuales, fisiología del estrés y comportamiento tipo ansioso. Dando como resultado que la RMN afectó el momento de los primeros hitos, el crecimiento somático y la fisiología del estrés en ambos sexos, sin embargo, sólo las hembras mostraron tener efectos a largo plazo en sus comportamientos relacionados a la ansiedad. Por otro lado, el modelo de SM afectó a hembras y machos de manera similar en el desarrollo temprano, sin embargo, sólo los machos mostraron cambios en la fisiología del estrés y resultados similares a la ansiedad. Los autores concluyen que para una mejor comprensión de los efectos de la RMN en las trayectorias de desarrollo físico, conductual y neural tempranas puede proporcionar nuevos conocimientos importantes sobre la forma en que el desarrollo de circuitos se adapta al entorno temprano. Específicamente, la RMN apoya un cambio en el tiempo de aumento de peso físico, maduración visual temprana, desarrollo motor y la maduración de un marcador asociado al estrés. Usando dos formas diferentes de RMN, tanto en ratones macho como hembras, hallaron que la presencia y el grado de efectos de RMN dependen del sexo y el tipo de adversidad experimentados. Los autores discuten que estos resultados ponen de relieve la naturaleza compleja de la RMN en lo que se refiere al organismo en desarrollo y que probablemente estos reflejan adaptaciones del sistema en respuesta al entorno de cuidado temprano (Demaestri et al., 2020).

Demaestri et al. mostraron que los fenotipos tipo ansioso y depresivo se presentan en mayor medida en ratones hembra que en ratones macho. Por su parte Orso et al. y Nieves et al. exploraron el impacto del protocolo RMN en dos distintas cepas de ratones, la cepa BALB/cJ y la cepa C57BL/6N.



En 2020 Orso et al. investigaron los efectos de un modelo combinado (SM y RMN) para la inducción de estrés en la vida temprana en la ansiedad y su relación con el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal, en la investigación titulada “*Maternal Separation Combined With Limited Bedding Increases Anxiety-Like Behavior and Alters Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function of Male BALB/cJ Mice*”. Para ello, se sometieron a ratones macho de la cepa BALB/cJ al protocolo de RMN y SM desde el DPN 2 al DPN 15. Los resultados a los llegaron sugieren que el fenotipo de ansiedad evaluado a través de las pruebas de CA (tiempo de permanencia y número de entradas en el centro), LEC (tiempo de permanencia y número de entradas en los brazos abiertos) y CCO (tiempo de permanencia en la zona clara) revelaron una mayor respuesta ansiosa de los animales RMN en comparación con el grupo de CTL. Los resultados de la expresión del gen del ARNm revelaron cambios significativos en los niveles del cortisol, hormona asociada al estrés. Además, este estudio evaluó el comportamiento materno de las madres durante el desarrollo temprano, en el que observaron cambios significativos en los patrones cuantitativos y cualitativos de la atención materna. Especialmente, observaron un desequilibrio en los patrones de posturas de amamantación (por ejemplo, disminución de la postura de amamantación con dorso arqueado y aumento de la postura de amamantación) a pesar del aumento de lamer/acicalar, construir nidos y el comportamiento materno total en las madres de RMN. Además, las madres RMN presentaron un aumento en el número de salidas del nido, lo que se considera un patrón de atención materna fragmentada. En conclusión, la exposición a un modelo combinado de SM y RMN provocó un aumento a largo plazo en el comportamiento tipo ansioso en las pruebas de CA, LEC y CCO. Este modelo combinado también dio lugar a una atención materna fragmentada y de baja calidad, debido a un aumento en el número de salidas del nido y una disminución de la frecuencia de posturas de amamantación arqueada. Además,



se identificó una importante alteración en la función del eje HPA. Los animales expuestos a RMN mostraron un aumento a largo plazo en los niveles hipotalámicos de ARN mensajeros de la hormona liberadora de corticotropina y una respuesta de corticosterona plasmática. Así pues, los investigadores sugieren que el modelo combinado propuesto de RMN puede generar un enfoque traslacional y confiable para imitar las características de las condiciones adversas de la primera vida humana, y aumentar la replicabilidad de los estudios preclínicos de RMN (Orso et al., 2020).

En 2020 Manzano-Nieves et al. identificaron en la investigación *“Early life stress impairs contextual threat expresión in female, but not male, mice”*, que los efectos de la RMN en el desarrollo del aprendizaje del miedo y la posible relación causal entre el neurodesarrollo y las consecuencias conductuales de la crianza sobre el aprendizaje del miedo y la expresión del miedo. Para ello utilizaron ratones C57BL/6N, los cuales fueron sometidos al protocolo de RMN del DPN 4 al DPN 11 y observaron que los ratones sometidos al procedimiento tuvieron un crecimiento físico retrasado durante el desarrollo postnatal, con un efecto más robusto en el cuerpo que en el cerebro. Además, cuando adultos fueron sometidos a condicionamiento contextual de amenaza, usando intensidades crecientes de shock eléctrico en las patas, las hembras, pero no los machos mostraron alteraciones en el aprendizaje contextual de amenaza, pues responden con menos congelamiento y reducen su capacidad para recordar el contexto asociado con la amenaza. Los autores discuten que la supresión transitoria del comportamiento de miedo asociado a la amenaza puede aumentar la toma de riesgos aumentar las posibilidades de incurrir al estrés y enmascarar los síntomas emocionales del trauma de la vida temprana durante el período peri-destete (Manzano-Nieves et al., 2020).

Todos estos estudios muestran que el paradigma RMN induce una alteración consistente en el patrón de cuidado maternal y que, a su vez, esta alteración es la que





impacta en el desarrollo socioemocional de la prole. No se ha abordado experimentalmente si las diferencias individuales pueden interactuar con las experiencias adversas en la infancia de modo que puede conferir susceptibilidad para el desarrollo de trastornos socioafectivos en la adultez.

## **Bases Teóricas**

### *Ansiedad*

Se considera a la ansiedad como una respuesta adaptativa e inevitable frente a lo que el entorno demanda de uno. (Cedillo et al., 2016). Así, la ansiedad guarda mucha correlación con el estrés (Pinel, 2007), por lo que puede ser vivenciado como desagradable y amenazador, llegando a provocar emociones como la inquietud o el pánico en la persona que lo experimenta (Masana citado en Rozman, 2020). A nivel fisiológico, se observa el aumento de la presión arterial, la frecuencia cardiaca, un aumento de la respiración y una activación elevada del sistema nervioso autónomo (Masana citado en Rozman, 2020).

Cuando la ansiedad se presenta en niveles leves, dígase de forma adaptativa, no representa una problemática, pues nos ayuda en la motivación, en el rendimiento y en el correcto desempeño de tareas cognitivas. Así como para afrontar situaciones percibidas como desafiantes o amenazadoras sin representar problema de salud, por lo tanto, es funcional (Dean, 2016). Sin embargo, cuando la ansiedad desborda las herramientas con las que la persona cuenta, puede desorganizar el organismo generando una respuesta inadecuada a un estímulo (Dean, 2016).

Por otro lado, cuando la ansiedad se presenta de forma patológica (trastorno de ansiedad), es decir: como el miedo crónico que se mantiene en ausencia de una amenaza



directa (Peres et al., 2017), se observan síntomas como confusiones y distorsiones de la percepción temporal y espacial, alterando la relación con las demás personas y el significado de los acontecimientos de la vida. Ello lleva a que el proceso de aprendizaje se vea interferido gracias a la disminución en la concentración, déficits en la memoria y el desgaste en las funciones asociadas a ésta (Bavley et al., 2017). También se ha observado que la ansiedad, en forma patológica, afecta el autoconcepto, la autoestima, el funcionamiento interpersonal y la adaptación social (Hidalgo & Sheehan, 2012) y está relacionada con una respuesta anormal del miedo.

Los alcances de diversas investigaciones demuestran que existen múltiples factores de riesgo asociados a la aparición de los trastornos de ansiedad, que oscilan desde el hecho de ser mujer, el grupo etario (Moreno-Peral et al., 2014), carencia de recursos económicos, eventos estresantes durante edades tempranas (Gómez-Restrepo et al., 2016), vivir en zonas expuestas a conflicto armado, maltratos y vejaciones intrafamiliares (Huerta et al., 2014), entre otros.

**Factores predisponentes y precipitantes de la ansiedad.** De acuerdo con Beck, Emery y Grenberg (citado en Vivero, 2010), no se puede atribuir uni-causalidad a los trastornos de ansiedad, debido a que coexisten varios factores que predisponen a dichos trastornos, entre ellos podemos hablar de factores hereditarios, enfermedades crónicas, así como acontecimientos traumáticos en el proceso del neuro desarrollo. A todo ello, se suman los modelos cognitivos que producen efectos contraproducentes, como nuestros aprendizajes y nociones preconcebidas.

Beck & Clark, 2010 plantean que “los trastornos de ansiedad pueden obedecer a una combinación singular de variables predisponentes y precipitantes”. Así pues, Beck



identifica cuatro factores predisponentes hacia vulnerabilidad y la tendencia a la ansiedad:

- **Genética:** Barlow y Serney (citado en Stein & Hollander, 2010) observaron que trastornos como las fobias, el trastorno obsesivo compulsivo y la angustia tienden a presentarse con mayor frecuencia entre parientes biológicos de primer grado (padres e hijos) en sujetos diagnosticados con estos tipos de trastornos. Si bien las condicionantes genéticas podrían explicar la manifestación de síntomas de ansiedad frente a ciertas situaciones o contextos, es importante considerar otros factores como los ambientales, psicológicos y sociales.
- **Trauma psicológico:** Beck (citado en Stein & Hollander, 2010) expone que los traumas experimentados durante la época de desarrollo se consideran como factores que aumentan la vulnerabilidad individual frente a la ansiedad. De acuerdo con Beck, la exposición a un evento traumático (momento de una exaltada activación emocional) interviene en la percepción individual (esquemas cognitivos) sobre la amenaza o evento. Por ejemplo, se verá la activación de estos esquemas en una persona con ansiedad, al verse expuestas a situaciones de peligro o en escenarios parecidos al evento traumático.
- **Ausencia de mecanismos de afrontamiento:** Como citan Stein & Hollander (2010), Beck menciona que la falta de respuestas de afrontamiento frente una situación incómoda y amenazadora, acompañada de una percepción distorsionada y negativa sobre los propios recursos que se dispone para enfrentarla, predispone al trastorno de ansiedad. A partir de ello, Beck considera que el desarrollado inadecuado, poco eficaz y no



satisfactorio de las estrategias de afrontamiento o, que una persona haya aprendido a utilizar respuestas de evitación, probablemente fortalece la ansiedad, a través de la vulnerabilidad frente a esta, impidiéndoles afrontar acontecimientos vitales o dificultades cotidianas.

- Pensamientos, creencias, supuestos y procesamiento cognitivo distorsionado: según el modelo cognitivo de Beck (citado en Stein & Hollander, 2010), los aprendizajes, las creencias, los pensamientos y el procesamiento de la información predisponen a las personas a responder con comportamientos ansiosos a eventos que interpretan como amenazantes o a situaciones donde puede identificar estímulos similares a las que configuraron estos esquemas.

**Sintomatología de la ansiedad.** Muriel et al. (2013) establecen una división de la sintomatología de tres tipos:

- Cognitivos: se caracteriza por la preocupación, el miedo, la inseguridad y la dificultad para decidir sobre uno mismo y de cómo comportarse ante otras personas, por el temor a fallar o perder el control frente a problemas cotidianos. Ello, genera en las personas que vivencian ansiedad problemas para procesar sus pensamientos, problemas de concentración y percepción Muriel et al. (2013)
- Fisiológicos: Muriel et al. (2013) observaron los síntomas más recurrentes que presenta una persona que está experimentando ansiedad suelen ser: la tensión muscular, la sudoración, taquicardias, molestias gástricas, dificultades respiratorias, sequedad de la boca, cefaleas, náuseas, mareos así como escalofríos. Todas estas reacciones fisiológicas pueden llegar a



ser potencialmente destructivas para organismo de las personas frente a la ansiedad patológica que es la respuesta desproporcionada a un estímulo determinado.

- Psicomotrices: los comportamientos más observados por Muriel et al. (2013) son: la evitación de situaciones identificadas como amenazantes, el abuso de la ingesta de alimentos y bebidas azucaradas, así como alcohólicas, movimientos repetitivos, rascarse y tocarse (intranquilidad motora), quedarse paralizado, entre otros.

Como vimos, el rango de ansiedad que se presenta en situaciones amenazadoras variará conforme a cada individuo, ya que cada persona tiene diversos predisponentes y grados de tensión y angustia que pueden llegar a afectar su integridad física y probablemente a crear ideas irracionales.

Pereyra (2008) considera tres características fundamentales para diferenciar los síntomas indicadores en un cuadro clínico en un nivel leve de ansiedad y un cuadro clínico en un nivel grave, dependiendo de la situación de peligro que la ansiedad puede causar:

- Intensidad: es el grado o nivel que un suceso o evento desata la aparición de la ansiedad que controla una persona;
- Duración: hace referencia al tiempo o momento en el que se presentan los síntomas que genera la ansiedad frente las situaciones cotidianas;
- Extensión: se considera extensión al tiempo y la fecha en que la ansiedad permanezca en el organismo del individuo.

**Ansiedad y modelos en animales.** Gracias al uso de modelos en animales, el estudio de la ansiedad ha tenido un gran acercamiento a nuevos saberes, ya que se han



podido estudiar algunas funciones mentales superiores humanas en su estado de normalidad o patológico (Kremer et al., 2021), así como investigaciones farmacológicas y su efectividad. Se estima que existen alrededor de 30 modelos esquematizados en animales, que nos permiten observar y cuantificar conductas de tipo ansiosa en animales: conductas defensivas resultantes del miedo (Pinel, 2007). Estos modelos buscan entender los fundamentos neurobiológicos de la ansiedad, para el desarrollo de tratamientos eficaces (Bourin et al., 2007). Según Gómez et al. (2002) para poder validar el uso de un modelo para el estudio de la ansiedad, se debe poder observar sustratos anatómicos y neuroquímicos relacionados con sistemas neurales involucrados con las reacciones defensivas de las especies, tanto para el nivel patológico y adaptivo de la ansiedad.

Estos modelos en animales pueden ser clasificados en dos grupos: los de respuesta condicionada y los que no involucran respuesta condicionada o modelos naturalistas. Dentro de los primeros se encuentran todos aquellos que se valen de respuestas condicionadas para evaluar la ansiedad. Como ejemplo contamos con el trabajo desarrollado en los estudios de Skinner; estos modelos incluyen procedimientos de castigo buscando modificaciones en el aprendizaje (Gómez et al., 2002). Referente al modelo que no involucran respuestas condicionadas, Rodgers, (1997) manifiesta que estos modelos revelan mayor variabilidad en los valores conductuales basales, tienen una mayor validez neurobiológica, ya que no requieren entrenamiento y, por ende, son menos susceptibles a la interferencia de procesos mnemónicos o motivacionales.

### ***Depresión***

De acuerdo con la American Psychiatric Association, (2013) la depresión es una condición psicológica y física caracterizada por la presencia de un ánimo triste, la sensación de vacío, estados de irritabilidad, que suele estar acompañada de cambios



somáticos y cognitivos que afectan la capacidad de la funcionalidad del individuo a nivel social, personal, laboral y familiar.

Cuando la depresión llega a ser considerada un trastorno debe tomarse en cuenta características como la duración de episodios de depresión, la presencia de síntomas y la etiología. El trastorno más representativo es el de la depresión mayor, caracterizada por episodios duraderos de cambios evidentes en el afecto, la cognición, funciones neurodegenerativas y remisiones interepisódica (Rakel, 1999).

Todo ser humano presenta cambios normales del estado de ánimo en respuesta a las circunstancias de nuestro contexto, el problema radica cuando las respuestas de las personas asumen un carácter inadecuado en términos de severidad, persistencia o circunstancias desencadenantes, conllevando así a un trastorno del estado de ánimo (El-Mallakh et al., 2015)

El trastorno del estado de ánimo con una amplia gama de síntomas, caracterizado por poseer un componente emocional extremadamente doloroso, presencia de tristeza, sentimientos de culpa, baja autoestima, apatía, cansancio, baja concentración, pérdida del apetito sexual, trastornos del sueño/apetito y pérdida de la capacidad para sentir placer (anhedonia), que se puede presentar de forma crónica o recurrente, dificultando el desarrollo de la vida cotidiana, es la depresión (American Psychiatric Association, 2013; El-Mallakh et al., 2015; Organización Mundial de la Salud OMS, 2017). El peligro mayor de este trastorno es la incidencia en las tasas de suicidio, pues los pensamientos de muerte e ideas suicidas suelen ser recurrentes (American Psychiatric Association, 2013).

Se estima que la principal discapacidad a nivel mundial es el Trastorno Depresivo Mayor (TDM). Suele comenzar en la etapa de la adolescencia y repercute en la adultez (Kessler, 2003). Al presentar cuadros sintomatológicos del TDM, las personas tienden a



perder la capacidad para sentir placer (anhedonia) sin razón aparente, lo que resulta en una imposibilidad de satisfacer requisitos básicos de la vida cotidiana como conservar un trabajo, mantener contactos sociales e incluso mostrar una adecuada higiene personal (Organización Mundial de la Salud OMS, 2017). Es por esto, que la OMS (2017) ve la depresión como un problema de salud pública pues, en el peor de los casos, conlleva a la conducta suicida.

La depresión parece tener muchas causas, dentro de las cuales se incluyen factores genéticos, factores químicos (alteraciones de neurotransmisores), y factores psicosociales (experiencias traumáticas tempranas, eventos inestables en la vida, red social limitada, baja autoestima) (Wielaard et al., 2017). Por esto, se puede decir que este trastorno, en la mayoría de los pacientes, es de carácter multifactorial y envuelve diversos ámbitos de la vida: familiar, biológico, psicológico y social (Brummelte & Galea, 2016).

### ***Adversidad en la infancia***

La adversidad en la infancia, también llamada adversidad en la vida temprana se define como una serie de eventos e interacciones que llegan a ser traumáticos en los periodos de la infancia y la adolescencia (Angelakis et al., 2020) como ser víctima de abuso físico, experimentar abuso emocional o sexual; vivir en un hogar donde se vivencia violencia domestica; ser familiar de una persona con problemas de abuso de sustancias o regulación del comportamiento (Green et al., 2010).

**Adversidad en la vida infancia y las emociones.** Los niños que vivenciaron eventos traumatizantes, debido a un entorno amenazante o por la carencia de recursos (privación), muestran una mayor sensibilidad a las señales de amenaza tanto desde el punto de vista conductual como neurobiológico (Gershon et al., 2013). Desde el punto de vista conductual, los niños expuestos a amenazas y privaciones identifican expresiones





faciales de ira más rápido, pero con menos información perceptiva, por lo que la habilidad para reconocer señales de amenaza, en comparación con los niños en desarrollo típico, es lenta (Pollak & Sinha, 2002). A nivel neurobiológico, se ha asociado el incremento de la actividad de amígdala, a través del incremento de cortisol, con experiencias de adversidad caracterizadas por amenazas y privaciones, en respuesta a señales de amenaza, como rostros temerosos o imágenes emocionales negativas (Maccari et al., 2014). Este efecto está presente en la infancia y persiste a través de la adolescencia, hasta la edad adulta (Ammerman et al., 1986). Un metaanálisis reciente confirma que el maltrato infantil, incluyendo el abuso y la negligencia, está asociado con una mayor reactividad de la amígdala a la amenaza y que esta reactividad aumenta en respuesta basada en la gravedad de la amenaza y la privación (Kaffman et al., 2021).

El resultado de una actividad mayor de amígdala, en respuesta a la amenaza, puede resultar en una mayor actividad emocional, o la tendencia a experimentar respuestas emocionales intensas y frecuentes (Maccari et al., 2014). La investigación ha demostrado un vínculo sólido entre la adversidad en la infancia y la actividad emocional (Weinstock, 2009). Los niños expuestos a adversidades caracterizadas por amenazas (por ejemplo, abuso) no solo son más reactivos emocionalmente a las señales faciales de amenaza (por ejemplo, expresión de ira), también muestran una mayor actividad de la amígdala a una amplia gama de estímulos negativos y neutrales que indica una mayor sensibilidad neurológica a una gama más amplia de señales ambientales (Pollak & Sinha, 2002)

**Regulación emocional y adversidad en la infancia.** La regulación emocional es la capacidad de reconocer las emociones y utilizar estrategias eficaces para modular la expresión o la experiencia de una emoción (Hogeveen et al., 2016). A partir de esta definición, podemos decir que las personas no sólo tienen emociones, también las



manejan (Brackett et al., 2006). La regulación de la emoción ocurre a través de numerosos procesos que actúan en múltiples puntos en la generación, expresión y experiencia de la emoción (Brackett & Mayer, 2003). La conectividad entre la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala juegan un papel crítico en la regulación de las emociones. Mientras que la amígdala detecta y responde a las amenazas del medio ambiente, la PFC modula la actividad en la amígdala para alterar la experiencia de la emoción (Ochsner & Gross, 2005). La regulación emocional exitosa se asocia con un mayor acoplamiento funcional del PFC y la amígdala. En diversos estudios, haber vivido experiencias de adversidad en la infancia, particularmente experiencias de abuso y violencia, está asociada a una mala capacidad de regulación de las emociones (Heleniak & McLaughlin, 2020). Este patrón se explica probablemente por alteraciones en la conectividad prefrontal-amígdala después del evento traumático (Ochsner & Gross, 2005). Múltiples estudios han demostrado que la adversidad que involucra la amenaza está asociada con una menor conectividad prefrontal-amígdala en reposo ((Herringa, 2017).

### ***El rol de las experiencias tempranas en el neurodesarrollo psicoafectivo***

Los períodos sensibles para el desarrollo cerebral son ventanas de tiempo en el que la maduración de ciertos circuitos cerebrales es especialmente susceptible a mudanzas por efecto del ambiente; es decir son altamente plásticos. Durante estos períodos de plasticidad los circuitos son moldeados por las experiencias, sean adversas o no. Particularmente las experiencias adversas pueden cambiar o alterar la trayectoria del desarrollo normal de esos circuitos, lo cual puede estar asociado con cambios también en los sistemas conductuales (Tottenham, 2012).

En la vida temprana, el desarrollo de la amígdala y la corteza prefrontal son especialmente sensibles, lo que significa que los estresores y condiciones



socioambientales son influentes en el curso y el desarrollo de estas áreas del cerebro que se relación con la afección y la cognición como también las conductas tipo depresivas y ansiosas, por lo que estrés en la vida temprana afectaría este desarrollo y marcaría el curso del desarrollo en la adolescencia hasta la madurez (Fareri & Tottenham, 2016).

### ***Adversidad en la vida temprana como factor de riesgo para la incidencia de trastornos depresivos***

Conforme con a la “*American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*” la relación entre el estrés en la vida temprana puede suscitar el riesgo de contraer depresión mayor antes de los 18 años. Se examinaron 8 tipos de estrés en la vida temprana (abuso sexual, abuso físico, pobreza, enfermedad física, muerte de un familiar, violencia doméstica, desastre natural, y abuso emocional) y el riesgo de depresión mayor en la adolescencia (citado en LeMoult et al., 2020).

En esta sociedad, las complejidades de la dinámica familiar, así como los cambios en otros factores ambientales sociales, pueden afectar en gran medida la relación cuidadores primarios e hijos. El abuso infantil, incluyendo el contacto sexual, el abuso físico y el descuido severo, es uno de los factores de riesgo de más alto nivel para muchos trastornos neuropsiquiátricos en pacientes adultos (Bremner & Vermetten, 2001). Es importante señalar que se sabe que los factores de estrés que se producen durante los períodos críticos de desarrollo, como la vida perinatal, producen efectos adversos en numerosos comportamientos y funciones fisiológicas, como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción, el sueño y la respuesta inmunológica (Kuhn & Schanberg, 1998). Por lo tanto, los estímulos ambientales tempranos y los factores estresantes probablemente causan un efecto permanente, más que transitorio, sobre el organismo. Por ejemplo, se ha informado de que las interrupciones de las interacciones típicas madre-



hijo inducen cambios persistentes en la neurobiología, la fisiología y el comportamiento emocional de los animales adolescentes y adultos al alterar la respuesta de los eje del hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA) (Ellenbroek et al., 2000).

La adversidad temprana en la infancia (por ejemplo, abuso, negligencia) representa más del 30% de todos los trastornos de ansiedad (Green et al., 2010) y se asocia con la desregulación emocional y conductual (McLaughlin et al., 2019).

Como han demostrado las observaciones clínicas que se remontan a Erikson (citado en Pinel, 2007), los hitos del desarrollo que marcan los períodos críticos para la maduración afectiva y cognitiva durante la vida temprana pueden predecir la función posterior. Un ejemplo de un predictor específico de déficits cognitivos o de regulación de emociones posteriores incluye el que no se logren los hitos del desarrollo del lenguaje a los 24 meses (Peyre et al., 2017). Dado que el momento y el patrón secuencial de adquisición de hitos forman un marcador importante de la integridad neurológica, estas medidas pueden proporcionar información crucial sobre los trastornos individualistas atribuibles a la adversidad temprana (Granata et al., 2021).

LeMoult et al. (2020) realizaron un metaanálisis usando bases de datos científicos que incluían información de estrés en la vida temprana y depresión mayor antes de los 18 años (62 artículos de revista con un total de 44 066 participantes). De este análisis, los autores encontraron que los individuos que experimentaron estrés en la vida temprana tenían mayor riesgo de desarrollar depresión mayor antes de los 18 años que personas que no experimentaron los estresores antes mencionados en la vida temprana. Sin embargo, encontraron también, que no todos los tipos de estresores tienen el mismo riesgo de incidir en depresión mayor, como es el caso de la “pobreza”, que cuando comparada con el factor de riesgo de “abuso emocional” no significa un riesgo para



contraer este trastorno. Este estudio concluye que la evidencia encontrada demuestra que los efectos del estrés en la vida temprana se manifiestan tempranamente en el desarrollo del trastorno de depresión mayor (LeMoult et al., 2020).

### *Interacción gen-ambiente en el desarrollo de trastornos ansiosos y depresivos*

De acuerdo con Kendler (2001) los factores genéticos contribuyen de manera significativa a la variación interindividual en la prevalencia de trastornos del estado de ánimo y ansiedad (Kendler, 2001), sin embargo, hay poca comprensión de cómo los genes interactúan con el estrés de la vida temprana para dar forma a la fisiopatología subyacente a estas condiciones. Una pregunta pendiente es cómo las variantes genéticas podrían modular el impacto del estrés de la vida temprana para hacer a algunos individuos vulnerables a enfermedades posteriores y dejar a otros relativamente resistentes incluso a traumas profundos (Charney, 2004). En este contexto, estudios recientes han demostrado que el riesgo de padecer afecciones como depresión mayor y trastorno de la personalidad aumenta en las personas que estuvieron expuestas a traumas infantiles y portan variantes genéticas (Hariri & Holmes, 2006). De ello, se puede decir que la investigación de las causas de la psicopatología se ha centrado en gran medida en dos factores etiológicos amplios: la vulnerabilidad genética (papel importante para los factores familiares/hereditarios) y los factores ambientales (Smoller, 2016).

Uno de los modelos que explica la relación gen-ambiente es el modelo de diátesis-estrés, según el cual una vulnerabilidad genética o predisposición (diátesis) interactúa con el ambiente y con los sucesos vitales estresantes para desencadenar conductas o trastornos psicológicos. Cuanto mayor sea la vulnerabilidad subyacente, menos estrés se necesita para desencadenar la conducta/trastorno. Y a la inversa, cuanto menor sea la contribución genética será mayor el estresante necesario para producir un resultado particular



(Rodríguez & Frías, 2005). La esencia de este modelo es que los genes y la adversidad, independientemente y en combinación, aumentan el riesgo de desencadenar desordenes conductuales o trastornos psicológicos (Smoller, 2016). En realidad, el estrés (especialmente la adversidad temprana y los eventos de vida estresantes posteriores) se ha identificado como un factor de riesgo para una gama más amplia de trastornos psiquiátricos, incluyendo el trastorno bipolar (Gilman et al., 2015) y la esquizofrenia (Matheson et al., 2013). Sin embargo, el papel de los entornos estresantes y la fisiología de los sistemas de respuesta al estrés se han vinculado más estrechamente a los trastornos depresivos, de ansiedad y de estrés traumático. Un punto importante es que decenas de diferentes genes están probablemente involucrados en la heredabilidad genética, parte subyacente del riesgo de trastornos relacionados con el estrés y la ansiedad. Siendo parte de ellos los genes pertenecientes al eje HPA sensibles al momento de la exposición al desarrollo relacionados con el trauma infantil (Sharma et al., 2016).

No obstante, hay determinados individuos que presentan una gran predisposición al estrés y consecuentemente al desarrollo de determinadas enfermedades orgánicas relacionadas con éste, pero que no terminan desarrollando estrés ante una situación determinada puesto que ponen en marcha determinadas estrategias protectoras del estrés. Entre estas estrategias se encuentran la evaluación cognitiva que la persona hace de la situación estresante y el tipo de estrategias de afrontamiento empleadas para hacer frente a dicha situación, entre otras (Rosales, 2014).

### ***Modelo de trabajo con ratones***

Sin duda los ratones y los humanos son genéticamente muy similares; compartimos entre el 95% y el 98% de nuestros genomas. Fisiológica y anatómicamente similares (The Jackson Laboratory, 2005)



Además de ser genéticamente similares, los humanos y ratones comparten muchas enfermedades neuromusculares. De hecho, las mismas causas genéticas de, por ejemplo, la distrofia muscular y las enfermedades de neuronas motoras, son comunes a humanos y ratones porque el "cableado" anatómico básico y las funciones son muy similares (Nollet et al., 2013).

### *Dimensiones de Ansiedad en el modelo animal*

Investigaciones con roedores menciona las características más relevantes en la medición de comportamientos de tipo ansioso se consideran a los comportamientos exploratorios espontáneos, viéndose en ello una disminución en su exploración, así como la evitación a lugares iluminado, elevados o abiertos (Harro, 2018). En el **Tabla 1** se mencionan los ítems considerados dentro del experimento:

**Tabla 1**

### *Dimensiones de Ansiedad en el modelo animal*

<b>Dimensión</b>	<b>Ítem</b>
Exploración	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tiempo de permanencia en área central.</li><li>• Tiempo de permanencia en brazos abiertos.</li></ul>
Evitación de lugares iluminados, elevados o abiertos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Número de entradas al área central.</li><li>• Número de entradas al brazo abierto.</li></ul>

### *Método para evaluar comportamientos de ansiedad en roedores*

Se han diseñado diferentes pruebas para evaluar comportamientos tipo ansiosos en los roedores, sin embargo, para evaluar sintomatología del Trastorno depresivo mayor se utilizan la exposición forzada de un roedor con un entorno nuevo, por ejemplo, un laberinto abierto o elevado, una caja de luz/oscuridad o evitar espacios abiertos.



Seguidamente se detalla las pruebas comportamentales que se utilizan para evaluar comportamientos tipo ansiosos en roedores:

- Test de Campo abierto: la prueba de campo abierto (CA) es una prueba sensorio motriz simple utilizada para determinar los niveles generales de actividad, la actividad locomotora gruesa y los hábitos de exploración en modelos de roedores, utilizada mayormente en estudios de ansiedad con el fin de probar nuevos compuestos ansiolíticos. La evaluación se realiza en una caja cuadrada donde se sigue el movimiento del animal en la zona central y las zonas periféricas (Kraeuter et al., 2019).
- Test Laberinto elevado en cruz: La prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) se usa para evaluar el comportamiento relacionado con la ansiedad en modelos de roedores. El aparato del LEC consiste en un laberinto en forma de "+", elevado sobre el suelo, con dos brazos cerrados en posición opuesta, dos brazos abiertos en posición opuesta y un área central, basada en la tendencia natural de los roedores a evitar los lugares abiertos o elevados. Mientras los ratones exploran libremente el laberinto, su comportamiento es grabado por medio de una cámara de video montada sobre el laberinto donde se observa en número de las entradas y el tiempo de permanencia en los brazos cerrados (Kraeuter et al., 2019a). Conforme a la literatura se espera que un ratón que presente comportamientos tipo ansiosos tienda a pasar más tiempo en los brazos cerrados (Rodgers, 1997).

### ***Dimensiones de la Depresión en los modelos animales***

Consideramos que un ratón presenta comportamientos tipo depresivos cuando se presentan síntomas como la inmovilidad frente a situaciones que ponen en riesgo su vida,





o la lucha por la supervivencia (Yan et al., 2010). En el **Tabla 2** se mencionan las dimensiones y los ítems considerados en el experimento:

**Tabla 2**

*Dimensiones de la Depresión en los modelos animales*

Dimensión	Ítem
Escape y desesperación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Latencia de primera inmovilidad.</li><li>• Tiempo total de inmovilidad.</li></ul>
Signos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Número de bolos fecales.</li></ul>

*Método para evaluar comportamientos de depresión en roedores*

A continuación, se detallan que métodos se usa para evaluar comportamientos de depresión en roedores:

- **Test de nado forzado:** Es una prueba común utilizada para evaluar la eficacia de los fármacos antidepresivos y los efectos de diversas manipulaciones conductuales y neurobiológicas en la investigación básica y preclínica (Yankelevitch-Yahav et al., 2015b). Esta prueba consiste en colocar al roedor en un tanque de agua provocando de esta manera una situación incómoda la cual es imposible de escapar. Se ha descrito como una situación en la que se induce la "desesperación conductual"; es decir, el animal pierde la esperanza de escapar del ambiente estresante (Can et al., 2012a).

**Cepas endogámicas C57BL/6NCrl y BALB/c.** Las cepas de ratones endogámicos son genéticamente idénticas y homocigotas en todos los loci (The Jackson Laboratory, 2005). El mundo científico en su conjunto, y específicamente el campo de la investigación biomédica, se ha beneficiado increíblemente de las cepas endogámicas de ratones. No hay muchos organismos modelo de animal que pueda estudiar si quiere



trabajar con una población de individuos genéticamente idénticos. Muchos investigadores pueden trabajar simultáneamente con estos ratones genéticamente idénticos y comparar los resultados, lo que los convierte en un recurso asombroso.

Conforme a The Jackson Laboratory, (2005) Las cepas de laboratorio estándar fueron derivadas de ratones domésticos mantenidos por criadores de ratones en Europa y Asia que contenían contribuciones genéticas de *Mus musculus domesticus*, *musculus*, *molossinus* y *castaneus*. La mayoría de las cepas endogámicas comenzaron como mascotas que luego fueron cruzadas. Cuando se domestica cualquier especie, también se eliminan las características silvestres, seleccionando aquellos animales que son fáciles de manejar y de criar. La desventaja es que también se selecciona en contra de muchas variaciones genéticas. Debido a esto, los científicos encuentran útil cruzar ratones de una cepa endogámica estándar con una cepa de origen silvestre en estudios de cartografía genética en los que el genoma de origen silvestre introduce miles de marcadores genéticos variables.

#### **Cepas endogámicas C57BL/6NCrl y BALB/c y fenotipos comportamentales.**

Heinla et al., (2018) descubrieron, en su investigación “*Behavioural characterization of C57BL/6N and BALB/c female mice in social home cage – Effect of mixed housing in complex environment*”, que los ratones C57BL/6 y BALB/c presentan varias diferencias de comportamiento (incluidas las relacionadas con la ansiedad y el comportamiento social). La consecuencia predominante fue la influencia aversiva de los ratones BALB en el repertorio conductual de la cepa C57BL. Al igual que estudios anteriores, se observó que los ratones C57BL/6 muestran menos ansiedad, son más resistentes al estrés y emocionalmente más estables que los ratones BALB/c.



Finalmente, los resultados a los que llegaron sugieren que la complejidad ambiental y el enriquecimiento social tienen un fuerte efecto en el comportamiento de los ratones C57BL/6N y BALB/c.

## **Hipótesis de investigación**

### ***Hipótesis General***

**Hg1:** Si se expone a dos cepas de ratones al protocolo RMN durante el DPN 2-9, entonces se inducirá alteraciones en la forma de sus comportamientos de tipo ansiosos y depresivos, donde los ratones de la cepa BALB/c se verán más afectados en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1, puesto que los ratones BALB/c tienden a comportamientos de tipo reactivo mayores frente a estresores.

### ***Hipótesis Específicas***

**He2:** La exposición a la adversidad en la vida temprana repercutirá de manera diferente en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en machos y hembras independiente de la cepa, siendo las ratonas hembra las más afectadas.

**He3:** El impacto de la adversidad en la vida temprana en forma de cuidados maternos fragmentados en las respuestas comportamentales de tipo ansioso y depresivo presentadas en el periodo del desarrollo de la adolescencia se mantendrán en el periodo del desarrollo de la adultez.

## **Variable**

### ***Identificación de variables***

#### **Independientes**

**Vi1:** Adversidad en la infancia.



**Vi2:** Cepa.

**Vi3:** Sexo.

### **Dependientes**

**Vd1:** Comportamientos tipo depresivos.

**Vd2:** Comportamientos tipo ansiosos.

### **Variables Controladas**

**Vc1-** Condiciones ambientales (temperatura, ciclo de luz y humedad)

**Vc2-** Estabulación (N° de ratones por jaula, material de nido, alimentación, agua y control de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>).



*Operacionalización de las variables*

**Tabla 3**

*Operacionalización de variables*

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Reactivos
Vi: Adversidad en la infancia.	Exposición a una gama de situaciones o experiencias difíciles o desagradables (Wearick-Silva et al., 2019).	Protocolo de restricción de cama y nido (RMN).	Cuidado materno fragmentado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frecuencia de lactancia.</li> <li>• Permanencia en nido.</li> <li>• Frecuencia de entradas y salidas del nido.</li> <li>• Frecuencia de acicalamiento a crías.</li> <li>• Frecuencia de auto acicalamiento.</li> <li>• Frecuencia de auto alimentación.</li> </ul>	Observación de comportamiento maternal.
Vd1: Comportamientos tipo depresivos	Trastorno del estado de ánimo con una amplia gama de síntomas, que se puede presentar de forma crónica o corriente, dificultando el desarrollo de la vida cotidiana (APA, 2013).	Comportamientos caracterizados por la ausencia de lucha por supervivencia.	Escape/desesperación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Latencia para entrar en inmovilidad o flotación</li> <li>• Duración de la inmovilidad/flotación</li> </ul>	Test de Nado Forzado
			Signos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Número de bolos fecales al final de cada evaluación</li> </ul>	Cuantitativo



---

Vd2: Comportamientos tipo ansiosos	Respuesta adaptativa frente a las demandas del entorno, y por ende inevitable (Cedillo Ildelfonso et al., 2016). La ansiedad se define como un correlato psicológico habitual del estrés (John P. J. Pinel, 2007), vivenciado como desagradable y amenazador que puede abarcar desde la inquietud hasta el pánico.	Patrones bajos de exploración, por medio de la exposición a desafíos donde se observa instintos de exploración versus la prevalencia por la evitación a lugares iluminados, abiertos o elevados.	Exploración Exposición de desafíos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tiempo de permanencia en área central</li><li>• Número de entradas al área central</li><li>• Número de entradas brazo abierto.</li><li>• Tiempo de permanencia en brazo abierto.</li></ul>	Tes de Campo Abierto.  Test de Laberinto Elevado en Cruz
			Signos fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Número de bolos fecales al final de cada evaluación</li></ul>	Cuantitativo

---



**Tabla 4**

*Operacionalización de variables controladas*

<b>Variables Controladas</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicador</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Escala</b>
Condiciones ambientales	Los ratones serán evaluados en ambientes que presenten las mismas características ambientales.	<ul style="list-style-type: none"><li>● Temperatura</li><li>● Luz</li><li>● Humedad</li></ul>	Cuantitativa	Nominal
Estabulación	Instalaciones del bioterio,	<ul style="list-style-type: none"><li>● Cantidad de ratones por jaula</li><li>● Alimentación</li><li>● Reproducción</li><li>● Gestación</li><li>● Anidación</li></ul>	Cuantitativa y cualitativa	Nominal



## Definición de términos

**Adversidad en la vida temprana.** Efecto que generará el protocolo de restricción de cama y nido, el cual que se aplicará a partir del DPN 2 hasta el DPN9.

**Cepa.** Serie de características fenotípicas, genotípicas, morfológicas y físicas. Para las investigaciones experimental se hacen uso de dos cepas estandarizadas: C57BL/6NCrl y BALB/c, que son el producto de una selección sistémica y continua de una raza específica de ratones.

**Comportamientos tipo depresivos.** Se infiere este tipo de respuesta comportamental a partir de la caracterización de ausencia de lucha por supervivencia (respuesta para salir de una situación de estrés inescapable).

**Comportamentales tipo ansiosos.** Inferencia de comportamientos caracterizados por patrones bajos de exploración, por medio de la exposición a desafíos donde se observa instintos de exploración versus la prevalencia por la evitación a lugares iluminados, abiertos o elevados.





## Capítulo 3: Método

### Alcances de la investigación

Esta investigación tuvo por objeto estudiar comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones de laboratorio de dos cepas endogámicas expuestas a un protocolo de escasez/adversidad en la infancia que fragmenta el perfil del cuidado materno, que a su vez induce cambios duraderos en la emocionalidad de las crías. A partir de ello se utilizó el alcance Explicativo. Por ese motivo, este trabajo se enfocó en estudiar los comportamientos tipo ansiosos y depresivos en ratones basados en protocolos previamente desarrollados y estandarizados, como son el uso de las pruebas de campo abierto, laberinto elevado en cruz y natación forzada. Los resultados de la investigación contribuirán al cuerpo de conocimientos en torno al papel crítico de las experiencias tempranas en el desarrollo de la emocionalidad y también permitirá levantar hipótesis específicas en torno a la susceptibilidad genética y de sexo para el desarrollo de psicopatologías y trastornos asociados a experiencias adversas en la infancia. Asimismo, los resultados de este estudio contribuirán a la discusión en el campo en torno a la contribución del fenotipo genético para la vulnerabilidad o resiliencia para-desarrollar alteraciones de la emocionalidad en el período adulto.

### Diseño de la Investigación

Para evaluar las hipótesis presentadas, se propuso un estudio de diseño experimental puro de tipo factorial. En este diseño se manipuló una de las tres variables independientes (adversidad en la infancia) para observar sus efectos sobre las variables dependientes (comportamientos tipo ansiosos y tipo depresivos) en una condición controlada. Además, para conocer hasta qué punto el efecto de la variable independiente manipulada sobre las variables dependientes, depende o no de las otras variables



independientes no manipuladas (sexo, cepa y edad), se planteó un plan experimental en el que aparecieron todas las combinaciones posibles de cada uno de los niveles de una variable independiente con la de las otras restantes.

Camadas	Tratamiento experimental (camada)	Adolescente (prole)			Adulto (prole)		
RG1	X1	O1	O2	O3	O4	O5	O6
RG2	-	O7	O8	O9	O10	O11	O12
RG3	X2	O13	O14	O15	O16	O17	O18
RG4	-	O19	O20	O21	O22	O23	O24
RG5	X3	O25	O26	O27	O28	O29	O30
RG6	-	O31	O32	O33	O34	O35	O36
RG7	X4	O37	O38	O39	O40	O41	O42
RG8	-	O43	O44	O45	O46	O47	O48

El estudio contó con cuatro grupos experimentales y cuatro grupos control (vea diagrama). Considerando la camada como unidad experimental, la asignación de las camadas a cada grupo se realizó aleatoriamente. Luego del destete, la prole de ratones fue segregada y alojada por sexo en una jaula hasta el período adulto. La evaluación de las variables dependientes se realizó en el período adolescente de la prole y se repitió en el periodo adulto (ver diagrama). Para la evaluación de las variables dependientes en el período adolescente y adulto, dos ratones macho y dos ratones hembra de cada camada fueron seleccionados al azar y colocados para conformar los grupos experimental y control. De modo que, cada grupo experimental y control que pasó por la evaluación de las variables dependientes fueron conformados por ratones procedentes de 10 a 11 camadas. El diseño experimental puro de tipo factorial que se propuso fue de 3x2 para las siguientes combinaciones de las variables independientes: 1) Factor A (tratamiento experimental: ELA y control) x Factor B (sexo: machos y hembras) x Factor D (edad:



adolescente y adulto) y 2) Factor A (tratamiento experimental: ELA y control) x Factor C (cepa: BALB/c y C57BL/6NCrl) x Factor D (edad: adolescente y adulto).

**Tabla 5**

*Diagrama de diseño factorial 3 x 2 (tratamiento experimental x sexo x edad)*

		FACTOR B (Sexo)		
		Nivel B1 (Hembra)	Nivel B2 (Machos)	
FACTOR A (Tratamiento)	Nivel A1 (ELA)	A1B1	A1B2	ADOLESCENTE
	Nivel A2 (Control)	A2B1	A2B2	
FACTOR A (Tratamiento)	Nivel A1 (ELA)	A1B1	A1B2	ADULTO
	Nivel A2 (Control)	A2B1	A2B2	

**Tabla 6**

*Diagrama de diseño factorial 3 x 2 (tratamiento experimental x cepa x edad)*

		FACTOR C (Cepa)		
		Nivel B1 (BALB/c)	Nivel B2 (C57BL/6NCrl)	
FACTOR A (Tratamiento)	Nivel C1 (ELA)	A1C1	A1C2	ADOLESCENTE
	Nivel A2 (Control)	A2B1	A2C2	
FACTOR A (Tratamiento)	Nivel C1 (ELA)	A1B1	A1C2	ADULTO
	Nivel A2 (Control)	A2B1	A2C2	



## Materiales y Metodología

### *Sujetos*

Se utilizaron 240 ratones en total (120 machos y 120 hembras) provenientes de veinticuatro camadas de las cepas C57BL/6NCr1 (C57) y BALB/c (BALB) distribuidos aleatoriamente en dos grupos llamados control ( $n=60$  por cepa y sexo) y experimental ( $n=60$  por cepa y sexo). Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la UAC, en una sala con condiciones controladas de ciclo luz/oscuridad de 12 horas (iniciando el ciclo de luz a las 06:00 horas). La temperatura y humedad fueron mantenidas en un margen de 22°C-24°C y 25-30%, respectivamente. En cuanto a su alimentación, los ratones contaron con acceso *ad libitum* a agua y comida.

Respecto a la reproducción de las camadas, se utilizó un grupo de 4-5 ratones hembra adultas vírgenes (8 semanas de edad). Este grupo fue juntado con un ratón macho reproductor durante 4-5 días. Terminado este periodo, se separaron a las hembras del macho. Estas fueron observadas cada cinco días para verificar la gestación. La gestación se comprobó a través de la ganancia de peso corporal, así como por la visualización del crecimiento del vientre. En el día gestacional (DG) 15-17, las hembras fueron individualizadas en cajas estándares de acrílico transparente (35 cm de largo, 15 cm de alto y 18 de ancho) con abundante viruta (1000 ml) para que preparen su nido y paran a sus crías. Hasta el momento de la individualización, los ratones fueron alojados en grupos de cuatro en sus jaulas estándares, y mantenidos en los estantes automatizados en condiciones ambientales descritas arriba.

A partir del DG 19 se verificó el parto por medio de dos observaciones diarias: una observación en la mañana y la siguiente en la tarde, de las jaulas de las hembras gestantes individualizadas. Consideramos el día del parto como el día postnatal (DPN) 0



y no se manipuló a las camadas hasta en DPN 2, día en que se fueron estandarizadas a 6 crías, manteniendo, en lo posible, la misma proporción de machos y hembras (3 machos y 3 hembras).

Cada camada (madres y crías) permaneció juntas hasta el día del destete, el cual ocurrió el DPN 22. En el destete, las crías fueron separadas de su madre y distribuidas por sexo, alojadas en jaulas estándares mantenidos en los estantes de estabulación en las condiciones ambientales descritos arriba hasta el momento de las evaluaciones comportamentales. Las evaluaciones comportamentales se desarrollaron en dos periodos del desarrollo, uno en la adolescencia (DPN 45-49) y el otro en la adultez (DPN 75-79). Para estos procedimientos se utilizaron no más de cuatro crías por camadas, dos de cada sexo.

#### **Criterios de inclusión**

- Ratones adolescentes y adultos: DPN 45-49 y DPN 75-79.
- Peso corporal estándar: machos: 25- 30 g. y hembras: 20-26 g.
- Ratones sanos no expuestos a un procedimiento previo.
- Ratones que no expuesto a apareamiento.
- Ratones controles.

#### **Criterios de Exclusión**

- Ratones con peso mejor a los estándares.
- Ratones expuestos a un procedimiento previo

#### ***Aspecto Ético***

Toda manipulación y procedimiento de los animales de experimentación fue realizada de acuerdo con las recomendaciones de *Guide for the Care and Use of*



*Laboratory Animals* (National Research Council, 2011) y la aprobación del Comité de Ética de estudio con animales de la Universidad Andina del Cusco (Protocolo #2019-001-IACUC-1).

### ***Paradigma de escasez/adversidad en la infancia***

Para este estudio utilizamos la restricción de material de cama y nido (RMN) para simular el paradigma de escasez/adversidad de acuerdo al protocolo previamente desarrollado para ratones (Rice et al., 2008).

El inicio de este protocolo se dio en el DPN 2, entre las 11h00-12h00, cuando las camadas fueron distribuidas aleatoriamente en un grupo control y un grupo experimental (ELA). Cada camada estuvo integrada por 3 crías machos y 3 crías hembras. Las camadas de grupo control se alojaron en jaulas estándares de acrílico transparente conteniendo 1000 mL de viruta y un pedazo de algodón de 5 x 5 cm. Las camadas del grupo experimental fueron alojadas en una jaula estándar de acrílico transparente conteniendo menos de 1 gramo de viruta y un pedazo de algodón de 2.5 x 5 cm colocados sobre una malla de acero galvanizado a 2 cm de la base de la jaula y con 200 mL de viruta en el fondo de la jaula para absorber los desechos líquidos de la camada como se muestra en la **Figura 1**. Durante todo este periodo (DPN 2 – DPN 9), las camadas no fueron perturbadas o manipuladas, salvo para reposición de comida y agua.

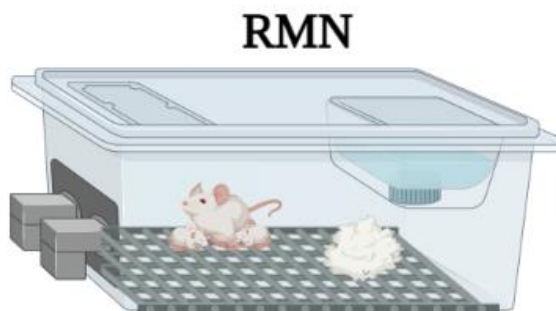
Las camadas de ambos grupos estuvieron alojadas en los estantes automatizados sin manipulación, con acceso libre a agua y comida, hasta el DPN 10. Llegado el DPN 10 las camadas del grupo experimental, así como las del grupo control fueron trasladadas a las jaulas estándares de acrílico transparente conteniendo 1000 mL de viruta, con acceso libre a agua y comida. A partir de ese momento las crías permanecieron con la madre hasta el DPN 22, día en el que las crías fueron separadas y puestas en jaulas distintas



diferenciadas por el sexo. Allí permanecieron alojadas hasta la llegada del periodo de vida adolescente y adulto, etapas donde se les aplicó las evaluaciones de comportamientos de tipo ansioso y depresivo.

### Gráfico 1

#### *Jaula Camada Grupo Experimental*



Nota: Representación gráfica de jaulas estándares de acrílico transparente conteniendo 1000 mL de viruta y un pedazo de algodón de 5 x 5 cm

#### *Evaluación de comportamientos de tipo ansiosos durante la adolescencia y adultez*

En los períodos del desarrollo correspondientes a la adolescencia (DPN 45-49) y adultez (DPN 75-79), dos ratones macho y dos ratones hembra de cada camada pasaron por evaluaciones comportamentales de respuestas relacionadas a la ansiedad y depresión. Los animales fueron evaluados en tres tipos de pruebas comportamentales. Primero fueron evaluados en la prueba del campo abierto, dos días después fueron evaluados en la prueba del laberinto elevado en cruz y dos días después fueron evaluados en la prueba de la natación forzada.

Los días de aplicación de pruebas comportamentales, los ratones fueron trasladados a la sala de evaluación una hora antes al inicio de las evaluaciones,



mantenidos en condiciones de luz, temperatura y humedad semejantes al de la sala de estabulación. Todas las evaluaciones comportamentales se registraron con una vídeo cámara sincronizada al software Ethovision de Noldus y almacenados para el análisis. Al término de las evaluaciones, los animales retornaron a sus respectivas jaulas y se los llevó de regreso a su sala de estabulación. Los mismos animales evaluados en el período de la adolescencia fueron evaluados en el período de la adultez.

**Prueba de laberinto de campo abierto (CA).** La prueba de campo abierto permitió evaluar la actividad exploratoria de los roedores, el cual consistió en exponer al animal a un campo abierto con paredes limitantes durante un tiempo determinado para observar diversos comportamientos exploratorios como correr en círculos, olisquear (*sniffing*), levantarse en las patas posteriores (*rearing*), acicalarse (*grooming*), mover las vibrisas, entre otros (Seibenhener & Wooten, 2015). También fue posible observar el lugar donde el animal paso más tiempo realizando comportamiento de exploración, en la zona central o en la periferia del laberinto, así como si hubo mayor o menor activación del sistema nervioso autonómico medido a través del número de bolos fecales y restos de orina (Gould et al., 2009). La cantidad de cada uno de estos comportamientos pudieron ser medidos a través de la cuantificación del número de secciones o cuadrados de ambiente cruzados por el animal, como un indicador de actividad exploratoria. Por otro lado, esta prueba también permitió evaluar parámetros de emocionalidad en los roedores basado a través del porcentaje del tiempo de exploración en las paredes de la arena en relación con el centro (tigmotaxis). Específicamente, un mayor porcentaje de tiempo que el animal pasa explorando las paredes de la arena y mayor defecación son considerados indicadores de elevados niveles de ansiedad (Gould et al., 2009). Para evaluar comportamientos relacionados a la ansiedad en los ratones de





nuestro estudio, se realizó la prueba de campo abierto en la etapa de la adolescencia (DPN 45) al igual que en la adultez (DPN 75).

Para la evaluación se seleccionó aleatoriamente a los ratones, los cuales llevaron una marca en la cola para distinguirlos de los no evaluados. Los ratones seleccionados para evaluación fueron tomados cuidadosamente por la cola para colocarlos en una caja cuadrada de acrílico transparente (50 cm de largo y 50 cm de ancho), el cual cuenta con una arena de 30 x 30 cm donde se les grabó en vídeo durante diez minutos. Para ello se montó un cámara desde la parte superior para grabar el comportamiento de los ratones dentro del instrumento.

Luego se cerró las cortinas alrededor del instrumento para disminuir las señales externas a la arena iluminada por la luz blanca del techo de la sala de evaluaciones. Para proceder con la vídeo grabación se accionó el software de monitoreo por diez minutos. Llegada la evaluación a su fin, se retornó al ratón a su jaula, se contó la cantidad de bolos fecales y se observó la presencia de orina.

Entre cada sesión de evaluación todo el aparato fue limpiado a fondo con alcohol al 70%. Los vídeos fueron analizados por medio de un programa de software de monitoreo de comportamiento automatizado (Ethovision de Noldus) y se evaluó el número de entradas al área central y tiempo de permanencia en el área central (segundos).

Al terminar la evaluación de todas las camadas, los ratones fueron retornados a la sala de estabulación.

**Prueba en el laberinto elevado en cruz (LEC).** La prueba de laberinto elevado en cruz permitió observar comportamientos exploratorios en los roedores en un laberinto elevado a 66 cm del piso con dos brazos abiertos opuestos y dos brazos cerrados opuestos.



En este tipo de laberinto, ratas y ratones muestran mayor exploración de los brazos cerrados y tienden a evitar los brazos abiertos y elevados. Así, parámetros como latencia para entrar, número de entradas a brazos cerrados y abiertos, tiempo de exploración en brazos cerrados y abiertos, entre otros pueden ser medidos (A. Kraeuter & Guest, 2019). En este test, el nivel de ansiedad en el animal es inferido a partir de la cantidad de tiempo que el animal pasa explorando en los brazos cerrados del laberinto en relación al tiempo que explora los brazos abiertos, pues el test se basa en la tendencia natural de los roedores para evitar lugares abiertos o elevados contrapuestos a su curiosidad innata para explorar lugares nuevos (A. Kraeuter & Guest, 2019).

Los animales de nuestro experimento fueron evaluados en el laberinto elevado en cruz con medidas de 53cm x 53cm en el DPN 47 y DPN 77. Encima de este se ubicó la cámara con la que se registraron todos los movimientos de los ratones seleccionados, sincronizado al software de monitoreo de comportamiento automatizado (Ethovision de Noldus). Para iniciar con la evaluación se tomó cuidadosamente de la cola a los ratones -previamente seleccionados aleatoriamente para la prueba de campo abierto- y se los colocó en el centro del laberinto elevado en cruz (en el cruce de los dos brazos). Desde ese momento inicio la evaluación, así como la filmación de todo este proceso por un periodo de 5 minutos, donde medimos el tiempo transcurrido en los brazos abiertos en segundos (exploración), el número de transiciones entre los brazos cerrados y abiertos y el tiempo de permanencia en los brazos cerrados (segundos). Al finalizar la evaluación, se retornó al ratón a su respectiva jaula, se contó la cantidad de bolos fecales y se observó la presencia de orina. Al igual que con la prueba de campo abierto, el aparato fue limpiado a profundidad con alcohol al 70%. Los vídeos fueron almacenados y evaluados en un computador por medio del software ya mencionado.



**Prueba de la natación forzada (NF).** La prueba de natación forzada es uno de los ensayos más utilizados para el estudio del comportamiento tipo depresivo en roedores (Yankelevitch-Yahav et al., 2015a), la cual se basa en la observación de los roedores que cuando son expuestos a una situación estresante sin salida, un tanque con agua, inicialmente muestran movimientos vigorosos iniciales orientados a escapar de la situación seguido de una postura inmóvil (Porsolt et al., 2001). Se presume que este comportamiento de inmovilidad es el resultado de aprendizaje del animal en esta situación en la que es difícil de escapar, el cual también es considerada como una medida de desesperación conductual (Porsolt et al., 2001).

Las dimensiones del instrumentos que utilizamos para la prueba de natación forzada en ratones estuvo basada en estudios previos (Can et al., 2012b). La evaluación de natación forzada fue aplicada a los mismos ratones previamente evaluados en las dos anteriores pruebas (CA y LEC), esta vez en los DPN 49 y DPN 79.

Para esta evaluación se utilizó un cilindro acrílico transparente (43.5 cm de alto X 25 cm de ancho) llenado con agua a una temperatura de 26°C hasta 20 cm de altura desde de la base del cilindro. Allí se colocó al ratón por 6 minutos.

Frente al cilindro se colocó una cámara para registrar la latencia de la primera inmovilidad (cuando el ratón se queda inmóvil por 3 segundos seguidos). A partir del minuto 2 de la prueba se midió el tiempo de inmovilidad (segundos) hasta llegar al minuto seis. Finalizada la evaluación, se secó al ratón usando papel toalla, y luego se devolvió a su jaula con sus pares. Luego de contar y registrar el número de bolos fecales dejados en el tanque, se limpió el tanque de agua con ayuda de un cernidor, dejando limpia el agua para dos futuras evaluaciones más. El agua solo se utilizó para 3 evaluaciones, luego de ese periodo el agua fue descartada.



El análisis de los resultados se realizó de manera manual con ayuda de un cronómetro para medir el periodo de inmovilidad.



**Tabla 7**

*Pruebas comportamentales*

<b>Pruebas comportamentales</b>	<b>Autores</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Áreas de evaluación</b>	<b>Duración</b>	<b>Calificación</b>	<b>Validez y confiabilidad</b>
Test de Campo Abierto	Kraeuter, A.	Individual	Aproximación- evitación de lugares abiertos, iluminados y elevados	10 min	Contabilizar el tiempo que el animal pasa en los brazos abiertos, y número de transiciones entre cada brazo	Gray et al. (1981) consideran 4 factores para la validez de un modelo animal: <ul style="list-style-type: none"><li>• Mostrar analógico al trastorno humano, en la forma de manifestación y/o sintomatología.</li><li>• Que se pueda observar un cambio de comportamiento operacional.</li><li>• Reversibilidad de los cambios comportamentales a través tratamientos farmacológicos que son eficaces en humanos (ansiolíticos y antidepresivos)</li><li>• El modelo debe ser reproducible entre investigadores.</li></ul>
Test de Laberinto elevado en cruz	Montgomery, K.C.	Individual	Aproximación- evitación de lugares abiertos, iluminados y elevados	5 min	Contabilizar el tiempo que el animal pasa en los brazos abiertos, y número de transiciones entre cada brazo.	
Test de nado forzado	Porsolt, R. D.	Individual	Desesperación	6 min	Contabilizar el tiempo para la latencia del primer evento de inmovilidad y el tiempo total de inmovilidad	



**Procedimiento.** En el **Gráfico 2** se muestra la línea temporal de los experimentos propuestos. El proceso de experimentación inició desde el primer día de gestación (DG 0), realizándose observaciones continuas a las ratonas hasta el DG 15 que es cuando se verificó la gestación avanzada de las ratonas y se individualizó en jaulas con suficiente material de cama para anidar y parir. El día del parto fue considerado como día postnatal 0 (DPN 0). En el DPN 2 se seleccionó aleatoriamente las camadas que fueron colocadas al protocolo de restricción de material de nido (RMN) y las camadas de grupo control, las que permanecieron hasta el DPN 10.

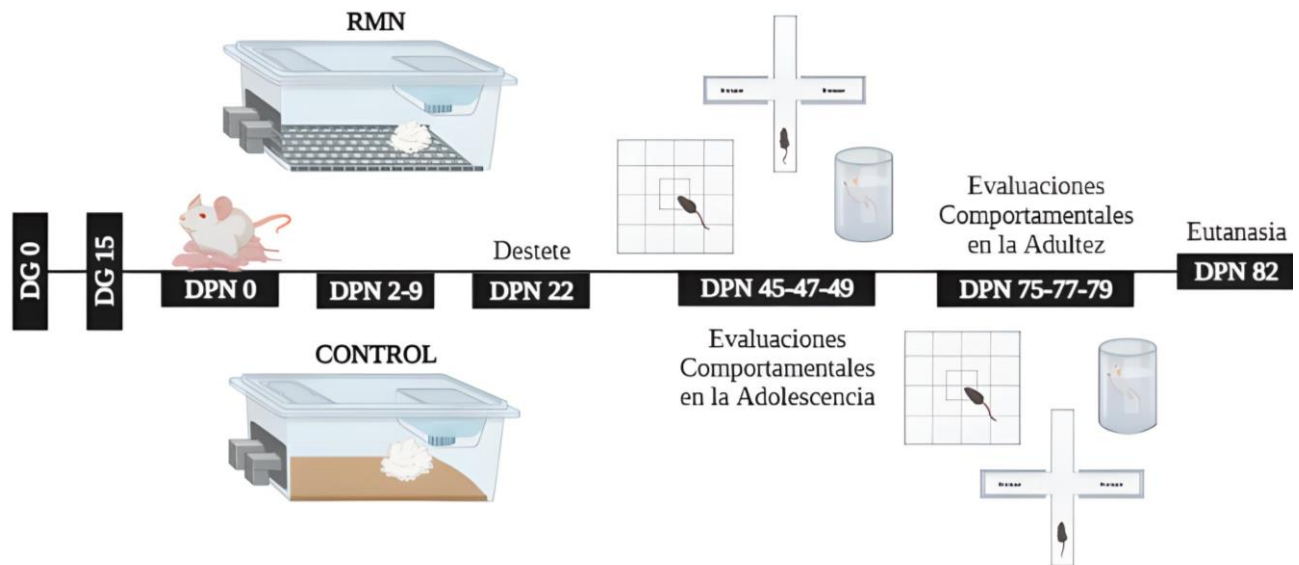
Terminado el protocolo, las camadas fueron colocadas en jaulas estándares con suficiente material de cama y nido, y permanecieron con sus crías hasta el DPN 22, día en el que se separó a la madre de sus crías, las cuales fueron distribuidas según su sexo en jaulas independientes. Las crías segregadas por sexo permanecieron en sus jaulas hasta el DPN 45, periodo en el que los ratones pasaron por evaluaciones comportamentales de campo abierto (CA), laberinto elevado en cruz (LEC) y natación forzada (NF) en los períodos correspondientes a la adolescencia. Las evaluaciones se realizaron en los DPN 45, DPN 47 y DPN 49 (**Gráfico 2**). Luego se esperó a que los ratones lleguen a la adultez (DPN 75) para volver a aplicarles las mismas evaluaciones comportamentales en tres momentos de su adultez: DPN 75, DPN 77 y DPN 79.

Finalmente se esperó hasta el DPN 82 para el procedimiento de eutanasia, respetando todos los protocolos de bioética.



## Gráfico 2

### *Línea temporal de experimentos*



Donde: DG: Día Gestacional; DPN: Día Post Natal; CA: Prueba de Campo Abierto; LEC: Prueba de Laberinto Elevado en Cruz; NF: Prueba de Nado Forzado.

### *Eutanasia*

Los animales adultos y crías que no se utilizaron en los experimentos fueron sometidos a eutanasia. Animales antes del destete fueron sometidos a eutanasia usando una tijera afilada. Los animales adolescentes y adultos fueron muertos mediante dislocamiento cervical rápido y decapitados rápidamente usando una tijera afilada. Los residuos biológicos fueron colocados en bolsas plásticas rojas rotuladas y enviadas para eliminación por una empresa especializada contratada por la UAC.

### *Análisis de datos*

Los registros comportamentales de las evaluaciones comportamentales depresivos y ansiosos fueron analizados a partir de las grabaciones y registros



digitalizados de comportamiento. Se analizó la latencia, frecuencia y duración de los comportamientos en las pruebas de campo abierto, laberinto elevado en cruz y natación forzada.

### *Análisis Estadístico*

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, USA). Antes de los análisis estadísticos comparativos, todos los datos pasaron por evaluación de distribución normal, usando el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron expresados como medias  $\pm$  ESM y el número de animales por grupo fue expresado como “n”. Se realizaron análisis estadísticos de tipo factorial ANOVA de dos vías para los factores protocolo (grupo control y grupo RMN) y sexo (macho y hembra) o cepa (C57BL/6NCrl y BALB/c), seguido del test *posthoc* de comparaciones múltiples de Tukey. Para todos los análisis, la hipótesis nula fue rechazada cuando el valor de  $p < 0,05$ . Las comparaciones estadísticamente significativas en las figuras y tablas están indicadas con asteriscos (\*).





## Capítulo 4: Resultados de la investigación

### Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo ansioso.

Los ratones de dos cepas expuestos al protocolo de adversidad en la infancia, durante la primera semana posnatal (DPN 2 – DPN 9), fueron evaluados en pruebas relacionadas a la ansiedad en los periodos adolescentes y adultos. A continuación, se relatan los resultados, considerando la interacción de Sexo x Protocolo, y Cepa x Protocolo.

#### *Campo Abierto*

El análisis ANOVA de dos vías, considerando los factores sexo y protocolo para los ratones C57 y BALB adolescentes y adultos, mostró un efecto principal del protocolo en los parámetros de número de entradas al área central y tiempo en el área central, mas no se encontró un efecto del factor sexo en ninguno de estos parámetros, como tampoco interacción entre los factores sexo y protocolo. Esto indica que tanto los ratones macho como hembra de la cepa C57 y BALB, de los dos periodos de edad, muestran un perfil semejante en los parámetros evaluados en la prueba de campo abierto, viéndose que el protocolo tiende a afectar más a las hembras pertenecientes al grupo RMN, en los dos periodos de edad, en comparación a los machos del grupo RMN, en los dos periodos de edad. Los detalles de este análisis pueden visualizarse en la **Tabla 8**.



**Tabla 8**

*Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansioso, según el sexo, en la prueba de Campo Abierto en dos etapas de la vida.*

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
<b>Prueba de Campo Abierto</b>			
<b><i>C57BL/Crl adolescentes</i></b>			
<i># Entradas al área central</i>	$F(1, 48) = 0.2442$ , $p=0,6235$	$F(1, 48) = 2.412$ , $p=0.1270$	$F(1, 48) = 0.8422$ , $p=0.3634$
<i>Tiempo en área central (s)</i>	$F(1, 48) = 0.1172$ , $p=0.7336$	$F(1, 48) = 8.206$ , <b><math>p=0.0062</math></b>	$F(1, 48) = 0.02583$ , $p=0.8730$
<b><i>BALB/c adolescentes</i></b>			
<i># Entradas al área central</i>	$F(1, 48) = 0,2715$ , $p=0,6047$	$F(1, 48) = 6,625$ , <b><math>p=0,0132</math></b>	$F(1, 48) = 0,5049$ , $p=0,4808$
<i>Tiempo en área central (s)</i>	$F(1, 48) = 2,543$ , $p=0,1174$	$F(1, 48) = 8,912$ , <b><math>p=0,0044</math></b>	$F(1, 48) = 0,1119$ , $p=0,7395$
<b><i>C57BL/Crl adultos</i></b>			
<i># Entradas al área central</i>	$F(1, 48) = 3,179$ , $p=0,0809$	$F(1, 48) = 4,688$ , <b><math>p=0,0354</math></b>	$F(1, 48) = 2,467$ , $p=0,1228$
<i>Tiempo en área central (s)</i>	$F(1, 48) = 2,173$ , $p=0,1470$	$F(1, 48) = 12,30$ , <b><math>p=0,0010</math></b>	$F(1, 48) = 1,759$ , $p=0,1911$
<b><i>BALB/c adultos</i></b>			
<i># Entradas al área central</i>	$F(1, 48) = 0,9886$ , $p=0,3251$	$F(1, 48) = 9,623$ , <b><math>p=0,0032</math></b>	$F(1, 48) = 0,8367$ , $p=0,3649$
<i>Tiempo en área central (s)</i>	$F(1, 48) = 0,1052$ , $p=0,7470$	$F(1, 48) = 0,9119$ , $p=0,3444$	$F(1, 48) = 1,140$ , $p=0,2910$

Nota. Tabla mostrando los resultados de análisis de ANOVA de dos días para la prueba de campo abierto de ratones adolescentes y adultos (DPN) de las cepas. Donde los resultados de  $p < 0.05$  están resaltados en negrita.



En la **Figura 1** observamos los resultados del efecto del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansiosos, según la cepa, en la prueba de campo abierto en dos etapas de la vida. Donde en la **Figura 1 A<sub>1</sub>** existen resultados significativos del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 117,5; p < 0,0001$ ], efectos significativos del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 5,395; p = 0,0245$ ] pero no se encontró interacción significativa entre ambos factores [ $F_{(1, 48)} = 0,5736; p = 0,4525$ ]. Esto indica que los ratones macho adolescentes pertenecientes a la cepa BALB muestran un mayor tiempo de permanencia en el área central, frente a los ratones macho adolescentes de la cepa C57 y que independiente de la cepa, los ratones RMN pasan más tiempo explorando el área central del laberinto.

En cuanto al número de entradas al área central (**Figura 1 A<sub>2</sub>**), se registró un efecto significativo del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 94,22; p < 0,0001$ ], así como una tendencia significativa del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 3,969; p = 0,0521$ ], aunque sin interacción de ambos factores [ $F_{(1, 48)} = 0,2587; p = 0,6133$ ]. Estos resultados indican que los ratones de la cepa BALB realizan un mayor número de entradas al área central que los ratones C57. Así mismo, los ratones RMN muestran una tendencia a entrar más veces al área central en comparación con sus controles (**Figura 1 A<sub>2</sub>**)

La **Figura 1 B<sub>1</sub>** muestra los resultados de permanencia en el área central en el CA, en el que se encontró interacción significativa entre los factores cepa y protocolo [ $F_{(1, 48)} = 8,497; p = 0,0054$ ], efecto principal del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 11,26; p = 0,0016$ ] y del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 15,20; p = 0,0003$ ]. Un análisis *post hoc* de Tukey reveló que los ratones macho adultos ELA de la cepa C57 muestran un tiempo de permanencia en el área central semejante que sus controles; los ratones RMN de la cepa BALB muestran un tiempo de permanencia en el área central del laberinto significativamente mayor que sus controles.



En la **Figura 1 B<sub>2</sub>** se muestra el número de entradas el área central del laberinto de ratones macho adultos. El análisis estadístico mostró que no existe significancia en la interacción de los factores [ $F_{(1, 48)} = 0,4804$ ;  $p=0,4916$ ] como tampoco efecto principal del factor cepa [ $F(1, 48) = 1,751$ ;  $p=0,1920$ ], pero sí se encontró un efecto principal del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 9,021$ ;  $p=0,0042$ ]. Esto indica que los ratones macho adultos del grupo RMN realizan un mayor de entradas al área central que los ratones del grupo control.

El análisis estadístico del tiempo de permanencia en el área central de las hembras adolescentes (**Figura 1 C<sub>1</sub>**) mostró un efecto significativo en el factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 125,6$ ;  $p<0,0001$ ], en el factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 11,18$ ;  $p=0,0016$ ], pero no se halló interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 2,446$ ;  $p=0,1244$ ]. Esto indica que los ratones hembra adolescentes de la cepa BALB muestran mayor tiempo de permanencia en el área central que las ratonas adolescentes de la cepa C57 y que las ratonas hembra adolescentes de ambas cepas sometidas al protocolo RMN pasan más tiempo en el área central que las ratonas control.

Referente a la cantidad de entradas al área central (**Figura 1 C<sub>2</sub>**), se encontró un efecto significativo del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 87,96$ ;  $p<0,0001$ ], y del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 4,936$ ;  $p=0,0310$ ]. Sin embargo, no se encontró interacción significativa entre ambos factores [ $F(1, 48) = 3,489$ ;  $p=0,0679$ ]. Por consiguiente, se indica que las ratonas hembra adolescentes de la cepa BALB realizan un mayor número de entradas al área central que las ratonas de la cepa C57. Igualmente se observa que las ratonas del grupo RMN de ambas cepas tienden a realizar un mayor número de entradas al área central que las del grupo control.

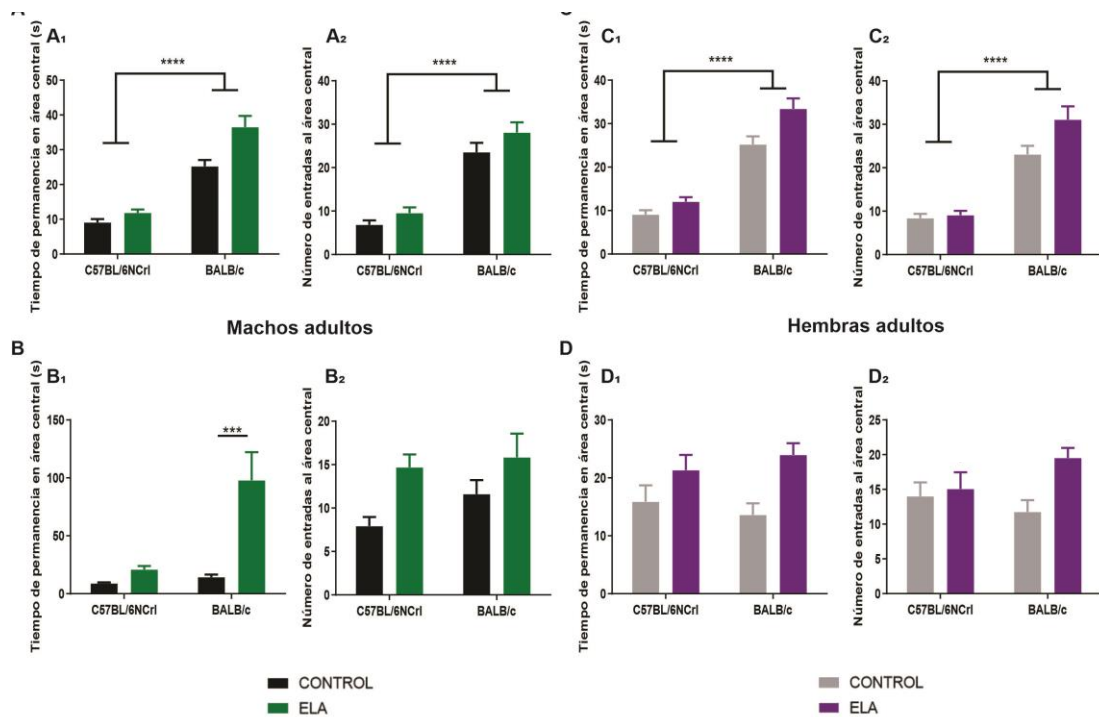


Concerniente a las ratonas hembra adultas, en el análisis estadístico del tiempo de permanencia en el área central (**Figura 1 D<sub>1</sub>**), no se halló interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 1,052; p=0,3101$ ] o efecto principal del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 0,005436; p=0,9415$ ] pero sí se encontró efecto principal para el factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 10,86; p=0,0019$ ]. Esto quiere decir que los ratones hembra adultas de ambas cepas que fueron sometidas al protocolo RMN muestran un número de entradas al área central mayor al de ratonas que no fueron sometidas al protocolo.

El análisis estadístico del número de entradas al área central del CA (**Figura 1 D<sub>2</sub>**) no mostró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 3,050; p=0,0871$ ] efecto principal del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 0,3389; p=0,5632$ ], pero sí se encontró significancia en el factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 5,330; p=0,0253$ ]. Esto indica que los ratones hembra adultas de ambas cepas expuestas al protocolo RMN, tienden a realizar más entradas al área central frente a sus respectivos controles.

**Figura 1**

*Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansioso, según la cepa, en la prueba de campo abierto en dos etapas de la vida.*



Donde: A: Ratones macho adolescentes; A1: Gráfico de resultados de tiempo de permanencia en área central contado en segundos; A2: Gráfico de resultados de número de entradas al área central; B: Ratones macho adultos; B1: Gráfico de resultados de tiempo de permanencia en área central contado en segundos; B2: Gráfico de resultados de número de entradas al área central; C: Ratones hembra adolescentes; C1: Gráfico de resultados de tiempo de permanencia en área central contado en segundos; C2: Gráfico de resultados de número de entradas al área central; D: Ratones hembra adultas; D1: Gráfico de resultados de tiempo de permanencia en área central contado en segundos; D2: Gráfico de resultados de número de entradas al área central. Las barras muestran valores de la media  $\pm$  el error estándar de la media (SE); \*: valor de  $P < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Control n: 13; RMN n: 13).



### *Laberinto Elevado en Cruz*

El análisis estadístico ANOVA de dos vías de los factores sexo y protocolo para los ratones C57 y BALB adolescentes y adultos, no mostró efectos significativos de los factores sexo y protocolo, como tampoco interacción significativa entre ambos factores en el periodo adolescente (**Tabla 9**). En el periodo adulto, el análisis estadístico del número de entradas en los brazos abiertos de los ratones de la cepa C57 no mostró una interacción significativa entre el factor sexo y protocolo, pero si se encontró un efecto principal del protocolo, pero no del sexo (**Tabla 9**). Esto indica que los ratones adultos C57 expuestos al protocolo RMN son afectados por el protocolo independiente del sexo.

El análisis estadístico del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto de ratones C57 adultos mostró una interacción significativa, un efecto principal del sexo y del protocolo (**Tabla 9**). Tras un análisis *post hoc* de Tukey se encontró que los ratones macho adultos de la cepa C57 del grupo RMN (M: 52,38 segundos) pasan más tiempo en el brazo abierto que sus respectivos controles (M: 8,762 segundos).

Por otro lado, el análisis estadístico del número de entradas o tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto de ratones BALB adultos no mostró interacción significativa entre los factores sexo y protocolo ni efectos principales de cada uno de los factores. Los detalles de este análisis pueden visualizarse en la **Tabla 9**.



**Tabla 9**

*Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansioso, según el sexo, en la prueba de Laberinto Elevado en Cruz en dos etapas de la vida*

Prueba de Laberinto Elevado en Cruz	Factores		Interacción
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
<i>C57BL/Crl adolescentes</i>			
# Entradas a brazo abierto	$F(1, 48) = 0,7245,$ $P=0,3989$	$F(1, 48) = 1,132,$ $P=0,2927$	$F(1, 48) = 2,662,$ $P=0,1093$
Tiempo en brazo abierto (s)	$F(1, 48) = 0,2196,$ $P=0,6415$	$F(1, 48) = 0,1281,$ $P=0,7220$	$F(1, 48) = 0,5867,$ $P=0,4475$
<i>BALB/c adolescentes</i>			
# Entradas a brazo abierto	$F(1, 48) = 2,706,$ $P=0,1065$	$F(1, 48) = 0,004329,$ $P=0,9478$	$F(1, 48) = 0,3506,$ $P=0,5565$
Tiempo en brazo abierto (s)	$F(1, 48) = 1,154,$ $P=0,2880$	$F(1, 48) = 0,02817,$ $P=0,8674$	$F(1, 48) = 0,2456,$ $P=0,6224$
<i>C57BL/Crl adultos</i>			
# Entradas a brazo abierto	$F(1, 48) = 0,02944,$ $P=0,8645$	$F(1, 48) = 9,998,$ <b><math>P=0,0027</math></b>	$F(1, 48) = 0,9138,$ $P=0,3439$
Tiempo en brazo abierto (s)	$F(1, 48) = 18,05,$ <b><math>P&lt;0,0001</math></b>	$F(1, 48) = 36,87,$ <b><math>P&lt;0,0001</math></b>	$F(1, 48) = 20,32,$ <b><math>P&lt;0,0001</math></b>
<i>BALB/c adultos</i>			
# Entradas a brazo abierto	$F(1, 48) = 0,04854,$ $P=0,8266$	$F(1, 48) = 0,1674,$ $P=0,6842$	$F(1, 48) = 1,079,$ $P=0,3042$
Tiempo en brazo abierto (s)	$F(1, 48) = 0,4965,$ $P=0,4844$	$F(1, 48) = 2,650,$ $P=0,1101$	$F(1, 48) = 0,4498,$ $P=0,5056$

Tabla mostrando los resultados de análisis de ANOVA de dos días para la prueba de laberinto elevado en cruz de ratones adolescentes y adultos (DPN) de las cepas. Donde los resultados de  $p<0.05$  están resaltados en negrita.





La **Figura 2** muestra los resultados del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansioso, según la cepa, en la prueba de laberinto elevado en cruz en dos etapas de la vida. El análisis estadístico del tiempo de permanencia en los brazos abiertos no mostró una interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 0,01523$ ;  $p=0,9023$ ], aunque se encontró un efecto principal en el factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 221,8$ ;  $p<0,0001$ ], pero no en el factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,9227$ ;  $p=0,3416$ ] (**Figura 2 A<sub>1</sub>**). Esto indica que los ratones macho adolescentes de la cepa BALB pasan explorando un mayor tiempo el brazo abierto que los ratones de la cepa C57.

El análisis del número de entradas al brazo abierto del laberinto no mostró interacción significativa entre ambos factores [ $F_{(1, 48)} = 1,016$ ;  $p=0,3185$ ] ni efecto principal del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 2,986$ ;  $p=0,0904$ ], aunque se encontró una tendencia significativa en el factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 3,504$ ;  $p=0,0673$ ] (**Figura 2 A<sub>2</sub>**). Lo que indica que los ratones de la cepa BALB tienden a entrar más veces al brazo abierto que los ratones de la cepa C57.

El análisis del tiempo de permanencia en los brazos abiertos de ratones macho adultos mostró una interacción significativa entre los factores cepa y protocolo [ $F_{(1, 48)} = 33,67$ ;  $p<0,0001$ ], así como efecto principal del en el factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 10,19$ ;  $p=0,0025$ ] y del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 15,53$ ;  $p=0,0003$ ]. Un análisis *post hoc* de Tukey, reveló que mientras los ratones BALB expuestos al protocolo mostraron un tiempo de permanencia semejante al de los ratones BALB del grupo control (M: CONTROL, 49,02 seg. vs RMN, 40,69 seg.), los ratones C57 expuestos al protocolo RMN mostraron un tiempo de permanencia significativamente mayor al de sus controles (M: CONTROL, 8,762 seg. vs RMN 52,38 seg.) (**Figura 2 B<sub>1</sub>**). Esto indica que el efecto del protocolo RMN en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos es dependiente de la cepa y afecta principalmente a los ratones macho adultos de la cepa C57.



El análisis del número de entradas a los brazos abiertos del laberinto en ratones macho adultos mostró una interacción significativa entre los factores cepa y protocolo [ $F_{(1, 48)} = 9,785; p=0,0030$ ] y una tendencia significativa para el efecto de los factores cepa [ $F_{(1, 48)} = 3,837; p=0,0560$ ] y protocolo [ $F_{(1, 48)} = 3,180; p=0,0809$ ] (**Figura 2 B2**). Un análisis *post hoc* de Tukey reveló que mientras los ratones macho adultos de la cepa BALB, expuestos al protocolo RMN, entran un número semejante de veces a los brazos abiertos del laberinto que sus controles (M: CONTROL, 12,54 seg. vs RMN, 10,77 seg.), los ratones RMN de la cepa C57 entran un número mayor de veces a los brazos abiertos que sus controles (M: CONTROL, 5,846 seg. vs RMN, 12,31 seg.).

Respecto a los ratones adolescentes hembras, el análisis estadístico no mostró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 6,576e-005; p=0,9936$ ], pero se halló un efecto principal del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 128,5; p<0,0001$ ], pero no se encontró un efecto principal del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,1070; p=0,7450$ ] (**Figura 2 C1**). Esto indica que los ratones hembra adolescentes de la cepa BALB, independiente del protocolo, pasan más tiempo en los brazos abiertos del laberinto comparado con los ratones hembra adolescentes de la cepa C57.

El análisis del número de entradas a los brazos abiertos del laberinto en ratones hembra adolescentes no mostró una interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 1,126e-030; p>0,9999$ ], pero sí se encontró un efecto significativo del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 16,76; p=0,0002$ ], y una tendencia significativa del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,2702; p=0,6056$ ] (**Figura 2 C2**). En donde se observa que los ratones hembra de la cepa BALB entran más veces al brazo abierto, contrario a los ratones hembra de la cepa C57. Así mismo, se observa una tendencia por parte de los ratones hembra sometidas al protocolo a ingresar en menor cantidad al brazo abierto.

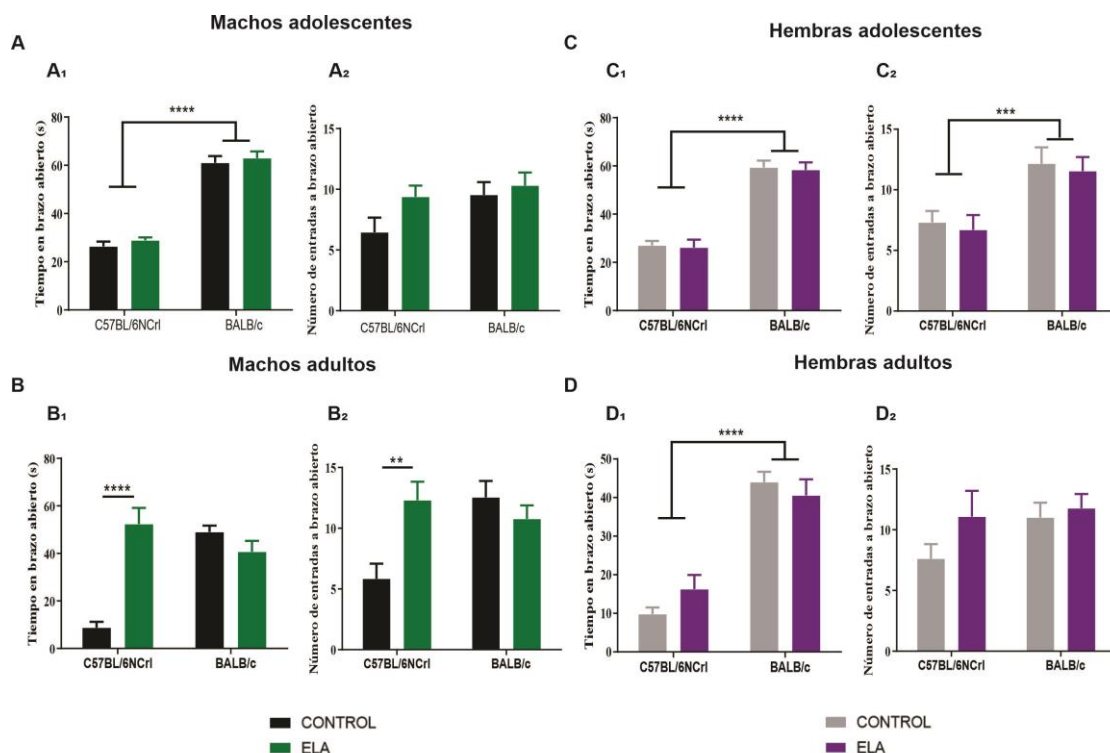


El análisis de tiempo de permanencia en los brazos abiertos de las hembras adultas no se encontró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 2,435; p=0,1252$ ], se encontró un efecto principal del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 84,77; p<0,0001$ ], pero no se encontró un efecto principal del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,2195; p=0,6415$ ] (**Figura 2 D<sub>1</sub>**). Lo cual indica que los ratones hembra adultas de la cepa BALB, independiente del protocolo, pasan más tiempo en los brazos abiertos del laberinto frente a los ratones hembra adulta de la cepa C57.

Respecto al número de entradas al brazo abierto (**Figura 2 D<sub>2</sub>**), el análisis no mostró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 0,8145; p=0,3713$ ], como tampoco se encontraron efectos significativos tanto del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 1,868; p=0,1781$ ], como del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 2,011; p=0,1626$ ].<sup>4</sup>

### Figura 2

*Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo ansioso, según la cepa, en la prueba de laberinto elevado en cruz en dos etapas de la vida.*





Donde: A: Ratones macho adolescentes; A<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo en brazo abierto contado en segundos; A<sub>2</sub>: Gráfico de resultados de número de entradas a brazo abierto; B: Ratones macho adultos; B<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo en brazo abierto contado en segundos; B<sub>2</sub>: : Gráfico de resultados de número de entradas a brazo abierto; C: Ratones hembra adolescentes; C<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo en brazo abierto contado en segundos; C<sub>2</sub>: : Gráfico de resultados de número de entradas a brazo abierto; D: Ratones hembra adultas; D<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo en brazo abierto contado en segundos; D<sub>2</sub>: Gráfico de resultados de número de entradas a brazo abierto; Las barras muestran valores de la media  $\pm$  el error estándar de la media (SE); \*: valor de  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (Control n: 13; RMN n: 13).

### **Efectos del protocolo ELA en los comportamientos de tipo depresivo**

Los ratones de dos cepas expuestos al protocolo de adversidad en la infancia, durante la primera semana posnatal (DPN 2 – DPN 9), fueron evaluados en pruebas relacionadas a la depresión en los periodos adolescentes y adultos. A continuación, se relatan los resultados, considerando la interacción de Cepa x Protocolo, y Sexo x Protocolo.

#### ***Nado Forzado***

Luego del análisis ANOVA de dos vías, considerando los factores sexo y protocolo para los ratones C57 y BALB adolescentes y adultos, se halló un efecto principal del protocolo en el parámetro de tiempo de inmovilidad, tanto del factor sexo como del factor protocolo, así como una interacción significativa entre ambos factores, en la etapa adolescente de los ratones de ambas cepas. Un análisis *post hoc* de Tukey, reveló que los ratones C57 adolescentes macho sometidos al protocolo muestran similar



tiempo de permanencia de inmovilidad que los ratones macho controles (M: CONTROL: 144,2 seg. vs RMN:143,5 seg.). Por otro lado, los ratones C57 hembra del grupo RMN muestran un menor tiempo de inmovilidad que los ratones hembra de grupo control (M: CONTROL:147,4 seg. vs RMN: 102,8seg), viéndose que el efecto protocolo es independiente del sexo (**Tabla 10**). En cuanto a los ratones de la cepa BALB, tras un análisis *post hoc* de Tukey reveló efecto contrario, ya que son los ratones hembra del grupo control y grupo RMN quienes muestran similares resultados en tiempo de inmovilidad (M: CONTROL: 113,2 seg. vs RMN:110,8 seg.), mientras que los ratones BALB machos del grupo RMN pasan menos tiempo inmóviles en comparación con sus controles (M: CONTROL: 115,8 seg. vs RMN: 66,27 seg.). Los detalles de este análisis pueden visualizarse en la **Tabla 10**.



**Tabla 10**

Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo depresivo, según el sexo, en la prueba de Nado Forzado en dos etapas de la vida.

Factores	Interacción		
	Sexo	Protocolo	Sexo x Protocolo
<b>Prueba de Nado Forzado</b>			
<i>C57 adolescentes</i>			
<i>Tiempo primera inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 1,418,$ $P=0,2396$	$F(1, 48) = 0,0007669,$ $P=0,9780$	$F(1, 48) = 3,201,$ $P=0,0799$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 6,105,$ <b><math>P=0,0171</math></b>	$F(1, 48) = 8,863,$ <b><math>P=0,0046</math></b>	$F(1, 48) = 8,387,$ <b><math>P=0,0057</math></b>
<i>BALB adolescentes</i>			
<i>Tiempo primera inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 0,8102,$ $P=0,3726$	$F(1, 48) = 1,362,$ $P=0,2489$	$F(1, 48) = 0,9092,$ $P=0,3451$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 6,984,$ <b><math>P=0,0111</math></b>	$F(1, 48) = 10,71,$ <b><math>P=0,0020</math></b>	$F(1, 48) = 8,776,$ <b><math>P=0,0047</math></b>
<i>C57 adultos</i>			
<i>Tiempo primera inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 2,307,$ $P=0,1354$	$F(1, 48) = 2,660,$ $P=0,1095$	$F(1, 48) = 0,01661,$ $P=0,8980$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 2,560,$ $P=0,1161$	$F(1, 48) = 6,980,$ <b><math>P=0,0111</math></b>	$F(1, 48) = 0,0007065,$ $P=0,9789$
<i>BALB adultos</i>			
<i>Tiempo primera inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 0,4841,$ $P=0,4899$	$F(1, 48) = 0,05563,$ $P=0,8145$	$F(1, 48) = 1,282,$ $P=0,2632$
<i>Tiempo de inmovilidad (s)</i>	$F(1, 48) = 1,275,$ $P=0,2645$	$F(1, 48) = 1,778,$ $P=0,1887$	$F(1, 48) = 0,1886,$ $P=0,6660$

Tabla mostrando los resultados de análisis de ANOVA de dos días para la prueba de nado forzado de ratones adolescentes y adultos (DPN) de las cepas. Donde los resultados de  $p < 0.05$  están resaltados en negrita.



Dentro de la **Figura 3** se muestra el impacto del protocolo RMN en los comportamientos de tipo depresivos, según la cepa, en la prueba de nado forzado en dos etapas de la vida. El análisis estadístico de la latencia para el primer evento de inmovilidad en los ratones macho adolescentes no mostró una interacción significativa de ambos factores [ $F_{(1, 48)} = 3,827; p=0,0563$ ], aunque se encontró efecto significativo del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 6,275; p=0,0157$ ], pero no se halló efecto significativo del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,2546; p=0,6162$ ] (**Figura 3 A<sub>1</sub>**). Esto indica que los ratones macho adolescentes de la cepa C57 entran en inmovilidad antes que los ratones macho adolescentes de la cepa BALB.

El análisis del tiempo de inmovilidad del mismo grupo etario de ratones mostró una interacción significativa de los dos factores [ $F_{(1, 48)} = 11,99; p=0,0011$ ], así como un efecto principal de la cepa [ $F_{(1, 48)} = 56,00; p<0,0001$ ] y así como del protocolo [ $F_{(1, 48)} = 12,60; p=0,0009$ ] (**Figura 3 A<sub>2</sub>**). Un análisis *post hoc* de Tukey reveló que el impacto del protocolo es dependiente de la cepa, siendo que los ratones RMN de la C57 pasan un tiempo de inmovilidad semejante a su grupo control, mientras que los ratones de la cepa BALB, sometidos al protocolo, tienden a pasar menos tiempo en estado de inmovilidad (M: 66, 27 seg) en comparación con sus respectivos controles (M: 115,8 seg).

El análisis de latencia para la primera inmovilidad en machos adultos no mostró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 3,233; p=0,0785$ ], aunque se encontró significancia en el factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 11,23; p=0,0016$ ], pero no se encontró en el factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 0,01676; p=0,8975$ ] (**Figura 3 B<sub>1</sub>**). Esto indica que los ratones macho adultos de la cepa C57 muestran un menor tiempo de entrada a primera inmovilidad, en comparación con los ratones macho adultos de la cepa BALB.



El análisis estadístico del tiempo de inmovilidad de machos adultos muestra una interacción significativa entre los factores [ $F(1, 48) = 4,592; p=0,0372$ ], aunque no se halló significancia en el efecto del factor cepa [ $F(1, 48) = 0,4627; p=0,4997$ ] o del factor protocolo [ $F(1, 48) = 0,1394; p=0,7105$ ]. Un análisis *post hoc* de Tukey no mostró significancia en la comparación de las medias (**Figura 3 B<sub>2</sub>**).

Con relación al desempeño de los ratones hembra adolescentes en el test de nado forzado, el análisis estadístico de la latencia para el primer evento de inmovilidad no mostró interacción significativa entre ambos factores [ $F(1, 48) = 0,3412; p=0,5619$ ], ni efecto principal del factor cepa [ $F(1, 48) = 0,2630; p=0,6104$ ] o del factor protocolo [ $F(1, 48) = 0,6953; p=0,4085$ ] (**Figura 3 C<sub>1</sub>**).

El análisis del tiempo de inmovilidad de ratones hembra adolescentes mostró una interacción significativa entre ambos factores [ $F(1, 48) = 6,265; p=0,0158$ ], así como un efecto significativo del factor protocolo [ $F(1, 48) = 7,814; p=0,0074$ ] pero no mostró un efecto significativo del factor cepa [ $F(1, 48) = 2,412; p=0,1270$ ]. Un análisis *post hoc* de Tukey reveló que los ratones hembra adolescentes de la cepa BALB del grupo RMN muestran un tiempo semejante de inmovilidad que sus respectivos controles. En cambio, los ratones hembra adolescentes de la cepa C57 del grupo del grupo RMN (M: 102, 8) muestran un menor tiempo de inmovilidad que los ratones hembra adolescentes del grupo control (M: 147, 4) (**Figura 3 C<sub>2</sub>**).

El análisis del tiempo de latencia para el primer evento de inmovilidad de las hembras adultas no mostró interacción significativa [ $F(1, 48) = 0,1590; p=0,6919$ ], tampoco se halló efecto principal del factor cepa [ $F(1, 48) = 2,374; p=0,1300$ ] o del efecto principal del factor protocolo [ $F(1, 48) = 1,315; p=0,2571$ ] (**Figura 3 D<sub>1</sub>**).

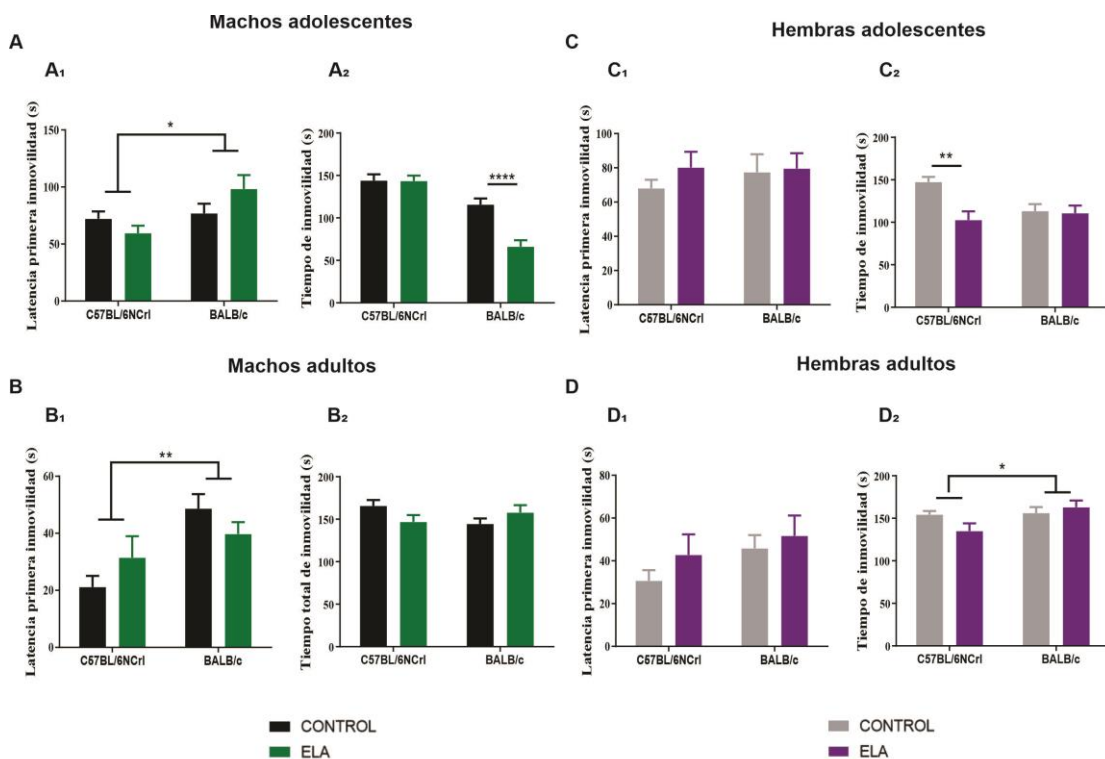




El análisis del tiempo de inmovilidad de hembras adultas no mostró interacción significativa entre los factores [ $F_{(1, 48)} = 3,240; p=0,0781$ ], pero sí se encontró un efecto significativo del factor cepa [ $F_{(1, 48)} = 2,374; p=0,130$ ], pero no del factor protocolo [ $F_{(1, 48)} = 1,315; p=0,2571$ ] (**Figura 3 D<sub>2</sub>**). Esto indica que los ratones hembra adulta de la cepa BALB pasan más tiempo de inmovilidad que lo ratones hembra adulta de la cepa C57.

### Figura 3

*Efectos del protocolo RMN en los comportamientos de tipo depresivos, según la cepa, en la prueba de nado forzado en dos etapas de la vida*



Donde: A: Ratones macho adolescentes; A<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de latencia de primera inmovilidad contado en segundos; A<sub>2</sub>: Gráfico de resultados de tiempo de



inmovilidad contado en segundos; C: Ratones macho adultos; B<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de latencia de primera inmovilidad contado en segundos; B<sub>2</sub>: : Gráfico de resultados de tiempo de inmovilidad contado en segundos; B: Ratones hembra adolescentes; C<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo de inmovilidad contado en segundos; C<sub>2</sub>: : Gráfico de resultados de tiempo de inmovilidad contado en segundos; D: Ratones hembra adultas; D<sub>1</sub>: Gráfico de resultados de tiempo de inmovilidad contado en segundos; D<sub>2</sub>: : Gráfico de resultados de tiempo de inmovilidad contado en segundos; Las barras muestran valores de la media  $\pm$  el error estándar de la media (SE); \*: valor de  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ (Control n: 13; RMN n: 13).



## Capítulo 5: Discusión

EL objetivo principal de esta investigación fue determinar de qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos C57BL/6NCrl y BALB/c. Para esto, camadas de ratones fueron expuestos al protocolo RMN durante la primera semana posnatal (DPN 2 – DPN 9), y las crías machos y hembras fueron evaluadas en pruebas clásicas de ansiedad y depresión durante el periodo adolescente (DPN 45 – DPN 49) y adulto (DPN 75 – DPN 79).

### **Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos**

#### *Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos*

Uno de los principales resultados de este estudio fue que los ratones adolescentes BALB machos y hembras se muestran menos ansiosos que los ratones de la cepa C57, puesto que los ratones adolescentes de la cepa C57, mostraron mayores comportamientos de tipo ansiosos comparado con los ratones de la cepa BALB, independiente del protocolo. Evaluados tanto en la prueba de campo abierto, así como en la prueba de laberinto elevado en cruz, los ratones adolescentes BALB muestran un mayor tiempo de permanencia en el área central y un mayor porcentaje de exploración en el brazo abierto. Estas diferencias basales entre cepas no fueron observadas en machos y hembras en el periodo adulto en la prueba de campo abierto, ni cuando evaluados en la prueba de laberinto elevado en cruz. En su lugar se observaron diferencias dependientes del protocolo.

En los comportamientos de tipo depresivos, diferencias entre cepas fueron encontradas en machos, mas no en hembras adolescentes. En el periodo adulto, estas



diferencias entre cepas fueron observadas solo en las hembras. Específicamente los ratones adolescentes macho de la cepa BALB mostraron un menor tiempo de inmovilidad que los ratones de la cepa C57. Este perfil cambia en los ratones adulto hembra de la cepa BALB porque pasan un mayor tiempo de inmovilidad comparado con los C57 evaluados en la prueba de nado forzado.

### ***Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo ansioso***

Los hallazgos principales de la investigación muestran que la adversidad en la infancia produce un impacto en sus comportamientos de tipo ansiosos, dependiente de la cepa y del periodo de desarrollo. Específicamente, encontramos que ratones hembra y macho adolescentes de la cepa C57BL/6Ncr1 fueron mayormente afectados en comparación con los ratones de la cepa BALB/c, como se infiere a partir del mayor número de entradas y mayor tiempo de permanencia en área central, en la prueba de campo abierto, así como por el mayor tiempo de permanencia y número de entradas a los brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz.

Estas diferencias en el efecto de la adversidad no se encontraron en el periodo adulto. Si bien en la etapa de la adolescencia los resultados mostraron que el impacto del protocolo RMN depende de la cepa, en la etapa de la adultez este factor cambia y se observa que el efecto del protocolo es independiente de la cepa y el sexo. Pues se halló que, en el periodo de la adultez los ratones que fueron sometidos al protocolo, tanto hembras y machos de las dos cepas endogámicas, no mostraron efecto o impacto de este en comparación con sus respectivos controles.

### ***Efecto de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo depresivo***



Nosotros encontramos que la adversidad en la infancia tuvo un efecto en los comportamientos de tipo depresivos en los ratones adolescentes macho y hembra dependiente de la cepa. Específicamente, el protocolo no afectó el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado de los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1 expuestos al protocolo RMN, pero redujo el tiempo de inmovilidad en el nado forzado de los ratones de la cepa BALB/c comparado a su control.

Si bien encontramos que el efecto de la adversidad es dependiente de la cepa, los ratones hembra de la cepa BALB/c no fueron afectados, pero en cambio los ratones hembra de la cepa C57BL/6Ncr1 expuestos a la adversidad en la infancia, mostraron una reducción del tiempo de inmovilidad comparado a sus controles. Esto sugiere que el protocolo afecta de manera cepa y sexo específicas solo en el periodo adolescente, pues en el periodo adulto no encontramos ningún efecto de la adversidad en la infancia en ninguna de las cepas y también en ninguno de los sexos.

### ***Discusión de los resultados más relevantes en comparación con la hipótesis***

Nuestra investigación trató de probar que si sometíamos a dos cepas de ratones endogámicos al protocolo RMN durante el DPN 2-9, entonces induciríamos alteraciones en la forma de sus comportamientos de tipo ansiosos y depresivos, donde los ratones de la cepa BALB/c fuesen los más afectados en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1.

Nuestros resultados mostraron que, si bien el protocolo RMN alteró los comportamientos tipo ansiosos y depresivos de las dos cepas de ratones endogámicos, no lo hizo en la dirección esperada; puesto que, al someter a los ratones de la cepa BALB/c al protocolo RMN, se observó una disminución de los comportamientos tipo ansiosos y



depresivos en comparación a los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1, quienes se mostraron más ansiosos.

Por otro lado, los resultados indicaron que tanto ratones macho y hembra de las dos cepas fueron afectados de igual manera. Negando de esta manera la primera hipótesis específica, la cual propuso probar que la adversidad en la vida temprana impactaría de manera diferente en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones macho y hembra independiente de la cepa, siendo las ratonas hembra las más afectadas.

Finalmente, planteamos comprobar que el impacto de la adversidad en la vida temprana, en forma de cuidados maternos fragmentados, en las respuestas comportamentales de tipo ansioso y depresivo, presentados en el periodo del desarrollo de la adolescencia se mantendría en el periodo del desarrollo de la adultez. Nuestros resultados niegan la segunda hipótesis específica, ya que los comportamientos tipo ansiosos y depresivos no se mantuvieron en las dos etapas del desarrollo, por el contrario, los comportamientos observados en el periodo de la adolescencia cambiaron en el periodo de la adultez.

### **Comparación crítica con la literatura**

#### ***Diferencias basales entre cepas en los comportamientos tipo ansiosos y depresivos***

Nuestro estudio encontró que los ratones de la cepa BALB/c machos y hembras adolescentes son menos ansiosos que los ratones de ambos sexos de la cepa C57BL/6NCr1. Específicamente, ratones de la cepa BALB/c muestran un mayor tiempo de permanencia en el área central y un mayor porcentaje de exploración en el brazo abierto, en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz, en comparación con los ratones la de cepa C57BL/6NCr1. Observándose el mismo efecto en machos y



hembras en el periodo adulto en la prueba de campo abierto, pero cuando evaluados en la prueba de laberinto elevado en cruz, se observó diferencias entre cepas en machos, más no en hembras. Estudios previos reportan que los ratones de la cepa BALB/c, evaluados en la prueba de campo abierto, muestran comportamientos ansiosos más altos que los ratones C57BL/6J (An et al., 2011; Moy et al., 2007). Sin embargo, otros estudios describen que los ratones de la cepa C57BL/6J son más ansiosos que los ratones de la cepa BALB/c, ya que estos pasan menos tiempo en los brazos abiertos al ser evaluados en la prueba de laberinto elevado en cruz (Brinks et al., 2007).

Nuestros hallazgos muestran que los ratones adolescentes macho de la cepa BALB/c son menos depresivos que los ratones de la cepa C57BL/6NCrI, y este mismo perfil también exhibieron los ratones hembra de la cepa BALB/c comparado con los C57BL/6NCrI evaluados en la prueba de nado forzado. Este efecto se observó en el periodo adolescentes, más no en el adulto. Estudios previos han demostrado que los ratones adolescentes exhiben diferencias con los ratones adultos en los comportamientos relacionados con el miedo, la ansiedad y la depresión y la reactividad al estrés (Adriani & Laviola, 2004), lo cual sugiere que los comportamientos tipo depresivos cambian conforme al periodo de desarrollo independiente de la cepa (Hefner & Holmes, 2007). Nuestro estudio sugiere que los ratones de la cepa C57BL/6NCrI son más depresivos que los BALB/c. Otras investigaciones, como la de Savignac et al. (2011) no muestran diferencia entre cepas en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

### ***Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo ansioso***

En nuestra investigación encontramos que los ratones de la cepa BALB/c no fueron afectados por el protocolo, tanto en la prueba de campo abierto como en la prueba de laberinto elevado en cruz, en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6NCrI



quienes fueron mayormente afectados, viéndose que los ratones adolescentes de esta última mostraron menos comportamientos de tipo ansioso que los ratones de la cepa BALB/c, independiente del sexo. Estos hallazgos sugieren que el protocolo RMN no incrementa el comportamiento tipo ansioso de los ratones, más bien parece ser que reduce los niveles de ansiedad de los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1. Conforme a estudios previos se sabe que la influencia de estímulos aversivos influye en el repertorio conductual de tipo ansioso en las cepas BALB y C57 (Razzoli, M. et al., 2011). Investigaciones previas reportan no haber encontrado resultados significativos en el tiempo de permanencia en el área central en la prueba de campo abierto en ratones de la cepa C57 sometidos a un protocolo semejante al nuestro (Rice et al., 2008, Gallo et al., 2019, Goodwill et al., 2019) así como en el tiempo en el brazo abierto del laberinto elevado en cruz (Goodwill et al., 2019, Manzano-Nieves et al., 2020). Mientras que otro estudio ha reportado que los ratones BALB sometidos al protocolo RMN se muestran ansiosos cuando evaluados en la prueba de campo abierto y la prueba de laberinto elevado en cruz. (Orso et al., 2020).

### *Efectos de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo depresivos*

En este estudio encontramos que el protocolo RMN tiene efecto que depende de la cepa, el sexo y la edad, puesto que el protocolo no afectó el tiempo de inmovilidad de la cepa C57BL/6Ncr1, pero se observó una reducción del tiempo de inmovilidad en el nado forzado de los ratones de la cepa BALB/c comparado a su control, solo en el periodo adolescente, pues en el periodo adulto no encontramos ningún efecto de la adversidad en la infancia. Estos hallazgos sugieren que el protocolo RMN no incrementa el comportamiento tipo depresivo de ninguna de las cepas, más bien reduce el comportamiento tipo depresivo de ratones de ambos sexos de la cepa BALB/c en el período adolescente pero este efecto no se extiende al período adulto. Nuestros hallazgos





son contrarios a los reportados por un estudio previo que ha reportado que ratones hembra de la cepa C57 expuestas al protocolo RMN pasan más tiempo inmóviles en la prueba de nado forzado (Goodwill et al, 2019). Estas discrepancias tal vez sean debido, al menos en parte, a las peculiaridades de las cepas de ratones. Estudios previos como el de Sá- Calçada et al., (2015), han reportado diferencias fenotípicas en la prueba de nado forzado, basado en tiempo de inmovilidad, entre las cepas C57BL/6 y BALB /c, donde ratones C57BL/6 hembras muestran mayor comportamiento de tipo depresivos. Otros estudios han reportado que ratones macho BALB/c muestran más inmovilidad que los ratones C57BL/J (Nesher et al., 2012). Por otra parte, Sultana et al., (2019) no encontraron diferencias en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado en las dos cepas.

Dado que las cepas de ratones que usamos en este estudio son distinguidas por la variabilidad en su respuesta emocional, nosotros esperábamos que los ratones BALB/c sean más susceptibles a los efectos del protocolo RMN que los ratones de la cepa C57BL/6NCr1. Si bien ambas cepas expuestas al protocolo ELA mostraron cambios en su comportamiento tipo ansioso (C57BL/6NCr1) y tipo depresivo (BALB/c), estos cambios fueron de reducción de ansiedad y de comportamiento tipo depresivo, respectivamente. Estos hallazgos nos permiten pensar en posibles mecanismos resilientes a un evento de estrés crónico como es la exposición a un modelo de adversidad en la infancia. Futuros trabajos serán necesarios para explorar esta posibilidad, con diseños experimentales que permitan evaluar si este mismo perfil de respuesta tipo resiliente es observado cuando el animal es expuesto a adversidad en la vida temprana y luego es expuesto a un segundo estresor fuerte o “trauma” en la adolescencia o la vida adulta.

### **Limitaciones del estudio**



Nuestra investigación muestra que el protocolo RMN no afecta en la dirección esperada los comportamientos tipo ansioso y tipo depresivo de los ratones de las cepas C57BL/6NCr1 y BALB/c. Por lo que consideramos que factores como evaluaciones comportamentales que se repiten en dos etapas de la vida de los ratones, pudo haber alterado los resultados de la segunda evaluación, ya que es posible que generen aprendizaje o adaptación.

Es posible que los resultados disten de nuestras hipótesis debido a factores ambientales como la iluminación, ya que no se usó la misma intensidad de iluminación de los instrumentos, como son la prueba de campo abierto, el laberinto elevado en cruz y los cilindros de nado forzado, como los reportados en la literatura. Así mismo, se sabe que el tiempo de aplicación de estos instrumentos no son siempre lo mismo, ya que hay investigaciones cuyo tiempo de evaluación de la prueba de CA es de 5 minutos (Rice et al., 2008), otras evalúan la prueba de LEC por 7 minutos (Manzano-Nieves et al., 2020), mientras que nosotros evaluamos por 10 y 5 minutos respectivamente. Sin embargo, en las pruebas de ansiedad, nuestros resultados son coherentes con algunos estudios reportados en la literatura, lo cual indica que, para efectos de medir ansiedad asociados a exploración en esos instrumentos, nuestros resultados replican los reportados por otros.

Finalmente, es posible que las respuestas comportamentales de ansiedad o tipo depresivos de los ratones que encontramos en este estudio se hayan visto influenciadas por la constante manipulación que se realizó al momento de cambiarles de jaula, al controlar su peso, al mantener la identificación constante y, quizá, hasta el ingreso del personal que labora con los ratones. Esta constante exposición a micro estresores puede haber moldeado las respuestas emocionales de los ratones en la dirección semejante a resiliente al que hemos encontrado y, el hecho de que esto haya ocurrido con los ratones expuestos a protocolo RMN, sugiere de que la alteración de la trayectoria de desarrollo



de los comportamientos emocionales son susceptibles a la alteración de la relación madre-infante durante la primera semana de vida postnatal y que este efecto parecer ser dependiente del genotipo del animal.

### **Recomendaciones**

Para mantener el control de identidad de los ratones, se recomienda utilizar herramienta de control de identidad que requieran de una sola aplicación y de fácil rastreo.

Con el fin de evitar posibles micro estresores, se recomienda buscar nuevas formas de manipulación tanto para el control de peso, como nuevas adaptaciones previas a las evaluaciones.

Nuestro protocolo puede ser utilizado en estudios posteriores para responder nuevas preguntas relacionadas a la resiliencia y comportamientos de tipo riesgoso en ratones de dos cepas endogámicas.

### **Implicancias del estudio**

Este estudio, muestra que la exposición a la adversidad en la infancia, a través del protocolo de restricción de material de cama y nido durante la primera semana posnatal (DPN 2 – DPN 9), no incrementa los comportamientos ansiosos y tipo depresivos en las crías machos y hembras en las pruebas clásicas de ansiedad y depresión durante el periodo adolescente (DPN 45 – DPN 49) y adulto (DPN 75 – DPN 79) en las cepas BALB/c y C57BL/Crl, más bien les reduce o no les afecta. Así pues, podemos descartar el protocolo RMN como un modelo de estrés crónico para inducir comportamientos de tipo depresivos y ansiosos en ratones de las cepas BALB/c y C57BL/Cr. Sin embargo, dada la dirección de los resultados, el modelo RMN en estas cepas de ratones podría ser usado para explorar



preguntas sobre la relación entre adversidad en la infancia y el desarrollo de respuestas emocionales resilientes en la vida adulta o comportamientos de riesgo, así como los mecanismos neurobiológicos involucrados.



## Conclusiones

**Primera.** De los resultados obtenidos, hallamos que al exponerse a dos cepas de ratones al protocolo RMN durante el DPN 2-9, se indujeron alteraciones en la forma de sus comportamientos de tipo ansiosos y depresivos, donde los ratones adolescentes y adultos machos y hembras de la cepa C57BL/6NCrI fueron más ansiosos y mostraron más comportamientos tipo depresivos que los ratones de la cepa BALB/c. Negando de esta manera nuestra hipótesis general.

**Segunda.** Nuestros resultados mostraron que la exposición a la adversidad en la vida temprana no repercutió de manera diferente en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en machos y hembras. Por el contrario, la exposición a la adversidad en la vida temprana afectó de manera semejante en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en machos y hembras independiente de la cepa.

**Tercera.** El impacto de la adversidad en la vida temprana en forma de cuidados maternos fragmentados en las respuestas comportamentales de tipo ansioso y depresivo presentadas en el periodo del desarrollo de la adolescencia cambian en el periodo de la adultez. Los ratones adolescentes, pero no adultos, machos y hembras de la cepa BALB/c mostraron comportamientos tipo depresivos reducidos, mientras que los ratones de la cepa C57BL/6NCrI no se vieron afectados en este comportamiento.



*Referencias bibliográficas*

Adriani, W., & Laviola, G. (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology*, *15*(5–6), 341–352. <https://doi.org/10.1097/00008877-200409000-00005>

Alves, R. L., Portugal, C. C., Summavielle, T., Barbosa, F., & Magalhães, A. (2020). Maternal separation effects on mother rodents' behaviour: A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *117*(May), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.008>

American Psychiatric Association. (2013). *DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF DSM-5™*.

Ammerman, R. T., Cassisi, J. E., Hersen, M., & Van Hasselt, V. B. (1986). Consequences of physical abuse and neglect in children. *Clinical Psychology Review*, *6*(4), 291–310. [https://doi.org/10.1016/0272-7358\(86\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0272-7358(86)90003-6)

An, X. L., Zou, J. X., Wu, R. Y., Ying, Y., Tai, F. D., Zeng, S. Y., Rui, J., Xia, Z., Liu, E. Q., & Hugh, B. (2011). Strain and sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57Bl/6J and BALB/cJ Mice. *Experimental Animals*, *60*(2), 111–123. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.111>

Anda, R. F., Felitti, V. J., Bremner, J. D., Walker, J. D., Whitfield, C., Perry, B. D., Dube, S. R., & Giles, W. H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood: A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *256*(3), 174–186. <https://doi.org/10.1007/s00406-005-0624-4>

Anderzhanova, E., Kirmeier, T., & Wotjak, C. T. (2017). Animal models in psychiatric



- research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. *Neurobiology of Stress*, 7, 47–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.003>
- Angelakis, I., Austin, J. L., & Gooding, P. (2020). Association of Childhood Maltreatment with Suicide Behaviors among Young People: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*, 3(8).  
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.12563>
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., & Merali, Z. (2001). Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: Mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral Neuroscience*, 115(2), 443–454.  
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.2.443>
- Baram, T. Z., Solodkin, A., Davis, E., Stern, H., Obenaus, A., Sandman, C. A., & Small, S. L. (2013). Fragmentation and Unpredictability of Early-Life Experience in Mental Disorders. *American Journal of Psychiatry*, 169(9), 907–915.  
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.11091347.Fragmentation>
- Bavley, C. C., Fischer, D. K., Rizzo, B. K., & Rajadhyaksha, A. M. (2017). Cav1.2 channels mediate persistent chronic stress-induced behavioral deficits that are associated with prefrontal cortex activation of the p25/Cdk5-glucocorticoid receptor pathway. *Neurobiology of Stress*, 7, 27–37.  
<https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2017.02.004>
- Beck, A., & Clark, D. (2010). *Terapia cognitiva para trastornos de ansiedad*.  
<https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=WZz-DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT4&dq=beck+1985+libros&ots=VnXjE9f3hB&sig=>



UmxmLKhxmgqcfmmogLZB5xc-lSc#v=onepage&q=beck 1985 libros&f=false

- Bolton, J. L., Molet, J., Ivy, A., & Baram, T. Z. (2017). New insights into early-life stress and behavioral outcomes. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *14*, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.12.012>
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *21*(6), 567–574. <https://doi.org/10.1111/J.1472-8206.2007.00526.X>
- Brackett, M. A., & Mayer, J. D. (2003). Convergent, discriminant, and incremental validity of competing measures of emotional intelligence. *Personality and Social Psychology Bulletin*, *29*(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1177/0146167203254596>
- Brackett, M. A., Rivers, S. E., Shiffman, S., Lerner, N., & Salovey, P. (2006). Relating emotional abilities to social functioning: a comparison of self-report and performance measures of emotional intelligence. *Journal of Personality and Social Psychology*, *91*(4), 780–795. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.91.4.780>
- Bremner, J. D., & Vermetten, E. (2001). Stress and development: Behavioral and biological consequences. *Development and Psychopathology*, *13*(3), 473–489. <https://doi.org/10.1017/S0954579401003042>
- Brinks, V., van der Mark, M., de Kloet, R., & Oitzl, M. (2007). Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: A combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.008.2007>
- Brummelte, S., & Galea, L. A. M. (2016). Postpartum depression: Etiology, treatment





and consequences for maternal care. *Hormones and Behavior*, 77, 153–166.

<https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2015.08.008>

Brunson, K. L., Kramár, E., Lin, B., Chen, Y., Colgin, L. L., Yanagihara, T. K., Lynch, G., & Baram, T. Z. (2005). Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2281-05.2005>

Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2012a). The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 59, 3638. <https://doi.org/10.3791/3638>

Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2012b). The mouse forced swim test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 59, e3638–e3638. <https://doi.org/10.3791/3638>

Cedillo Ildelfonso, B., López Zahar, J., Pérez López, A., Espíndola Domínguez, P., Ramos García, A., & Álvarez Herrera, O. (2016). Ansiedad En Los Estudiantes De La Facultad De Estudios Superiores Iztacala. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 19(2), 503–515.

Charney, D. S. (2004). Psychobiological Mechanism of Resilience and Vulnerability: Implications for Successful Adaptation to Extreme Stress. *American Journal of Psychiatry*, 161(2), 195–216. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.2.195>

Clark, C., Caldwell, T., Power, C., & Stansfeld, S. A. (2010). Does the Influence of Childhood Adversity on Psychopathology Persist Across the Lifecourse? A 45-Year Prospective Epidemiologic Study. *Annals of Epidemiology*, 20(5), 385–394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.02.008>



- Dean, E. (2016). Anxiety. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain))* : 1987), 30(46), 15. <https://doi.org/10.7748/NS.30.46.15.S17>
- Demaestri, C., Pan, T., Critz, M., Ofray, D., Gallo, M., & Bath, K. G. (2020). Type of early life adversity confers differential, sex-dependent effects on early maturational milestones in mice. *Hormones and Behavior*, 124(March), 104763. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104763>
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., & Hen, R. (2004). Effects of Chronic Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1321–1330. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300433>
- El-Mallakh, R. S., Wright, J. C., Breen, K. J., & Lippmann, S. B. (2015). Clues to depression in primary care practice. *Http://Dx.Doi.Org/10.3810/Pgm.1996.07.9*, 100(1), 85–96. <https://doi.org/10.3810/PGM.1996.07.9>
- Ellenbroek, B. A. E., van den Kroonenberg, P., & Cools, A. (2000). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia Research*, 41(2), 365–371. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(99)00080-8)
- Gallo, M., Shleifer, D. G., Godoy, L. D., Ofray, D., Olaniyan, A., Campbell, T., & Bath, K. G. (2019). Limited Bedding and Nesting Induces Maternal Behavior Resembling Both Hypervigilance and Abuse. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00167>
- Gershon, A., Sudheimer, K., & Hara, R. O. (2013). *The Long-Term Impact of Early Adversity on Late-Life Psychiatric Disorders*. <https://doi.org/10.1007/s11920-013-0352-9>



- Gilman, S. E., Sciences, B., Hospital, M. G., Ni, M. Y., Special, K., Region, A., Dunn, E. C., Unit, N. G., Hospital, M. G., Medical, H., Breslau, J., Mclaughlin, K. A., Smoller, J. W., Unit, N. G., Hospital, M. G., Medical, H., Perlis, R. H., & Hospital, M. G. (2015). *Recurrent Mania*. 20(3), 329–336.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2014.36>.Contributions
- Glynn, L. M., & Baram, T. Z. (2019). The influence of unpredictable, fragmented parental signals on the developing brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 53, 100736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.01.002>
- Gómez-Restrepo, C., Tamayo-Martínez, N., Buitrago, G., Guarnizo-Herreño, C. C., Garzón-Orjuela, N., Eslava-Schmalbach, J., de Vries, E., Rengifo, H., Rodríguez, A., & Rincón, C. J. (2016). Violencia por conflicto armado y prevalencias de trastornos del afecto, ansiedad y problemas mentales en la población adulta colombiana. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 45, 147–153.  
<https://doi.org/10.1016/J.RCP.2016.11.001>
- Gómez, C., Saldívar-González, J. A., & Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1), 14–24.
- Goodwill, H. L., Manzano-Nieves, G., Gallo, M., Lee, H. I., Oyerinde, E., Serre, T., & Bath, K. G. (2019). Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacology*.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0195-5>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods*, 42, 1–20. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>



- Granata, L., Valentine, A., Hirsch, J. L., Honeycutt, J., & Brenhouse, H. (2021). Trajectories of Mother-Infant Communication: An Experiential Measure of the Impacts of Early Life Adversity. *Frontiers in Human Neuroscience*, 15(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.632702>
- Gray, J. A., Davis, N., Feldon, J., Nicholas, J., Rawlins, P., & Owen, S. R. (1981). Animal models of anxiety. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*, 5(2), 143–157. [https://doi.org/10.1016/0364-7722\(81\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0364-7722(81)90064-3)
- Green, J. G., McLaughlin, K. A., Berglund, P. A., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Kessler, R. C. (2010). Childhood Adversities and Adult Psychiatric Disorders in the National Comorbidity Survey Replication I Associations With First Onset of DSM-IV Disorders. In *Arch Gen Psychiatry* (Vol. 67, Issue 2).
- Hariri, A. R., & Holmes, A. (2006). Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(4), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.02.011>
- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*, 352, 81–93. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.10.016>
- Hefner, K., & Holmes, A. (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 176(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.001>
- Heinla, I., Åhlgren, J., Vasar, E., & Voikar, V. (2018). Behavioural characterization of C57BL/6N and BALB/c female mice in social home cage – Effect of mixed housing



- in complex environment. *Physiology & Behavior*, 188, 32–41.  
<https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2018.01.024>
- Heleniak, C., & McLaughlin, K. A. (2020). Social-cognitive mechanisms in the cycle of violence: Cognitive and affective theory of mind, and externalizing psychopathology in children and adolescents. *Development and Psychopathology*, 32(2), 735–750. <https://doi.org/10.1017/S0954579419000725>
- Herringa, R. J. (2017). Trauma, PTSD, and the Developing Brain. *Current Psychiatry Reports 2017 19:10*, 19(10), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S11920-017-0825-3>
- Hidalgo, R. B., & Sheehan, D. V. (2012). Generalized anxiety disorder. *Handbook of Clinical Neurology*, 106, 343–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52002-9.00019-X>
- Hogeveen, J., Salvi, C., & Grafman, J. (2016). ‘Emotional Intelligence’: Lessons from Lesions. *Trends in Neurosciences*, 39(10), 694.  
<https://doi.org/10.1016/J.TINS.2016.08.007>
- Huerta, R., Bulnes, M., Ponce, C., Sotil, A., & Campos, E. (2014). Depresión y ansiedad en mujeres en situación de maltrato en la relación de pareja según tipo de convivencia , en zonas urbano-marginales de la ciudad de Lima kind of marital cohabitation in the slum areas in Lima city . Resumen. *Theorema*, 1, 123–136.
- Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., & Baram, T. Z. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.019>
- John P. J. Pinel. (2007). *Biopsicología* (6e ed.). Pearson.



[https://www.academia.edu/41091575/Biopsicologia\\_6e\\_John\\_P\\_J\\_Pinel\\_2007\\_](https://www.academia.edu/41091575/Biopsicologia_6e_John_P_J_Pinel_2007_)

Kaffman, A., Herringa, R. J., & Sanchez, M. M. (2021). Editorial: Effects of Early Life Stress on Neurodevelopment and Health: Bridging the Gap Between Human Clinical Studies and Animal Models. *Frontiers in Human Neuroscience*, *15*(October), 10–13. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.751102>

Kendler, K. S. (2001). Twin studies of psychiatric illness: An update. *Archives of General Psychiatry*, *58*(11), 1005–1014. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.11.1005>

Kessler, R. C. (2003). THE EFFECTS OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON DEPRESSION. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Psych.48.1.191](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Psych.48.1.191), *48*, 191–214. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PSYCH.48.1.191>

Kessler, R. C. (2006). The epidemiology of depression among women. *Women and Depression: A Handbook for the Social, Behavioral, and Biomedical Sciences*, *74*, 22–38. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511841262.004>

Kessler, R. C., McLaughlin, K. A., Green, J. G., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., Aguilar-Gaxiola, S., Alhamzawi, A. O., Alonso, J., Angermeyer, M., Benjet, C., Bromet, E., Chatterji, S., De Girolamo, G., Demyttenaere, K., Fayyad, J., Florescu, S., Gal, G., Gureje, O., ... Williams, D. R. (2010). Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO world mental health surveys. *British Journal of Psychiatry*, *197*(5), 378–385. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.080499>

Kopp, C., Vogel, E., & Misslin, R. (1999). Comparative study of emotional behaviour in three inbred strains of mice. *Behavioural Processes*, *47*(3), 161–174. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00057-1)



- Kraeuter, A., & Guest, P. C. (2019). *The Elevated Plus Maze Test for measuring Anxiety-like Behavior in Rodents*. *1916*, 69–74.
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019a). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 69–74. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019b). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 99–103. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9)
- Kremer, M., Becker, L. J., Barrot, M., & Yalcin, I. (2021). How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *European Journal of Neuroscience*, *53*(1), 236–270. <https://doi.org/10.1111/EJN.14686>
- Kuhn, C. M., & Schanberg, S. M. (1998). Responses to maternal separation: Mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *16*(3–4), 261–270. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00034-3)
- LeMoult, J., Humphreys, K. L., Tracy, A., Hoffmeister, J. A., Ip, E., & Gotlib, I. H. (2020). Meta-analysis: Exposure to Early Life Stress and Risk for Depression in Childhood and Adolescence. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *59*(7), 842–855. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2019.10.011>
- Maccari, S., Krugers, H. J., Morley-Fletcher, S., Szyf, M., & Brunton, P. J. (2014). The consequences of early-life adversity: Neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(10), 707–723. <https://doi.org/10.1111/jne.12175>
- Manzano-Nieves, G., Gaillard, M., Gallo, M., & Bath, K. (2020). Early life stress impairs



- contextual threat expression in female, but not male, mice. *Physiology & Behavior*, 4(132), 248–257. <https://doi.org/10.1037/bne0000248>.Early
- Matheson, S. L., Shepherd, A. M., Pinchbeck, R. M., Laurens, K. R., & Carr, V. J. (2013). Childhood adversity in schizophrenia: A systematic meta-analysis. *Psychological Medicine*, 43(2), 225–238. <https://doi.org/10.1017/S0033291712000785>
- McLaughlin, K. A., & Sheridan, M. A. (2016). Beyond Cumulative Risk: A Dimensional Approach to Childhood Adversity. *Current Directions in Psychological Science*, 25(4), 239–245. <https://doi.org/10.1177/0963721416655883>
- McLaughlin, K. A., Weissman, D., & Bitrán, D. (2019). Childhood Adversity and Neural Development: A Systematic Review. *Annual Review of Developmental Psychology*, 1(1), 277–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-devpsych-121318-084950>
- Mehta, M., & Schmauss, C. (2011). STRAIN-SPECIFIC COGNITIVE DEFICITS IN ADULT MICE EXPOSED TO EARLY LIFE STRESS. *Behav Neurosci*, 125(1), 29–36. <https://doi.org/10.1037/a0021952>
- Mills, M. S., Embury, C. M., Klanecky, A. K., Khanna, M. M., Calhoun, V. D., Stephen, J. M., Wang, Y.-P., Wilson, T. W., & Badura-Brack, A. S. (2019). *Traumatic Events Are Associated with Diverse Psychological Symptoms in Typically-Developing Children*. <https://doi.org/10.1007/s40653-019-00284-y>
- Millstein, R. A., Ralph, R. J., Yang, R. J., & Holmes, A. (2006). Effects of repeated maternal separation on prepulse inhibition of startle across inbred mouse strains. *Genes, Brain and Behavior*, 5(4), 346–354. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00172.x>
- Millstein, Rachel A., & Holmes, A. (2007). Effects of repeated maternal separation on





- anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.05.003>
- MIMP. (2022). Estadísticas - Mimp. In *Cubo de datos estadísticos de los servicios MIMP*.  
<https://www.mimp.gob.pe/omep/cubo-estadistico.php>
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2014). Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. In *Developmental Psychobiology*.  
<https://doi.org/10.1002/dev.21230>
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S., Baram, T. Z., & Edu, T. (2014). Naturalistic Rodent Models of Chronic Early-Life Stress HHS Public Access INTRODUCTION: A RATIONALE FOR NATURALISTIC MODELS OF. *Dev Psychobiol*, 56(8), 1675–1688. <https://doi.org/10.1002/dev.21230>. Naturalistic
- Morales Isla, M. de los A. (2021). Menores forzadas a ser madres siguen siendo niñas. *La República*, 6.
- Moreno-Peral, P., Conejo-Cerón, S., Motrico, E., Rodríguez-Morejón, A., Fernández, A., García-Campayo, J., Roca, M., Serrano-Blanco, A., Rubio-Valera, M., & Ángel Bellón, J. (2014). Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: A systematic review of cohort studies. *Journal of Affective Disorders*, 168, 337–348.  
<https://doi.org/10.1016/J.JAD.2014.06.021>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., Barbaro, J. R., West, L. M., Threadgill, D. W., Lauder, J. M., R., M. T., & Crawley, J. N. (2007). Mouse Behavioral Tasks Relevant to Autism: Phenotypes of Ten



Inbred Strains. *Behav Brain Res.*, 176(1), 4–20.

Muriel, S., Aguirre, M., Varela, C., & Cruz, S. (2013). *Ansiedad. Comportamientos Alarmantes Infantiles y Juveniles.: Vol. Volumen 1.* Ediciones Euroméxico.  
[https://tienda.sophosonline.com/libro/comportamientos-alarmanentes-infantiles-y-juveniles\\_275937](https://tienda.sophosonline.com/libro/comportamientos-alarmanentes-infantiles-y-juveniles_275937)

National Research Council. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.*  
In *The National Academies Press.*

Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (n.d.). *Animal Models of Neuropsychiatric Disorders.*  
<https://doi.org/10.1038/nn.2647>

Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders.  
*Nature Neuroscience*, 13(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>

Nollet, M., Le Guisquet, A. M., & Belzung, C. (2013). Models of Depression:  
Unpredictable Chronic Mild Stress in Mice. *Current Protocols in Pharmacology*,  
61(1), 5.65.1-5.65.17. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0565S61>

Ochsner, K. N., & Gross, J. J. (2005). The cognitive control of emotion. *Trends in  
Cognitive Sciences*, 9(5), 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2005.03.010>

Organización Mundial de la Salud OMS. (2017). *Depresión.*  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>

Orso, R., Creutzberg, K. C., Kestering-Ferreira, E., Wearick-Silva, L. E., Tractenberg, S.  
G., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal Separation Combined With Limited  
Bedding Increases Anxiety-Like Behavior and Alters Hypothalamic-Pituitary-  
Adrenal Axis Function of Male BALB/cJ Mice. *Frontiers in Behavioral*



- Neuroscience*, 14(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.600766>
- Peres, M. F. P., Mercante, J. P. P., Tobo, P. R., Kamei, H., & Bigal, M. E. (2017). Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. *Journal of Headache and Pain*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S10194-017-0742-1/FIGURES/1>
- Pereyra, M. (2008). *Decida ser feliz : cómo prevenir y superar la angustia, la ansiedad y la depresión*. Agencia de Publicaciones México Central,.
- Peyre, H., Charkaluk, M. L., Forhan, A., Heude, B., & Ramus, F. (2017). Do developmental milestones at 4, 8, 12 and 24 months predict IQ at 5–6 years old? Results of the EDEN mother–child cohort. *European Journal of Paediatric Neurology*, 21(2), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.11.001>
- Pollak, S. D., & Sinha, P. (2002). Effects of early experience on children’s recognition of facial displays of emotion. In *Developmental Psychology* (Vol. 38, Issue 5, pp. 784–791). American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/0012-1649.38.5.784>
- Porsolt, R. D., Brossard, G., Hartboi, C., & Roux, S. (2001). Rodent Models of Depression : Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral. *Current Protocols in Neuroscience, Supplement*, 1–10.
- Rakel, R. E. (1999). Depression. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 26(2), 211–224. [https://doi.org/10.1016/S0095-4543\(08\)70003-4](https://doi.org/10.1016/S0095-4543(08)70003-4)
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0633>



- Rodgers, R. J. (1997). Animal models of “anxiety”: where next? *Behavioural Pharmacology*, 8(6–7), 477–496. <https://doi.org/10.1097/00008877-199711000-00003>
- Rodríguez, M., & Frías, L. (2005). Algunos factores psicológicos y su papel en la enfermedad: una revisión. *Psicología y Salud*, 15(2), 169–185. <https://doi.org/10.25009/pys.v15i2.802>
- Rosales, R. (2014). Estrés y salud. In *Universidad de Jaén*.
- Rozman, F. (2020). *Farreras Rozman. Medicina Interna - 9788491135456*. <https://tienda.elsevier.es/farreras-rozman-medicina-interna-9788491135456.html>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). *Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. February*, 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Sharma, S., Powers, A., Bradley, B., & Ressler, K. (2016). Gene × Environment Determinants of Stress- and Anxiety-Related Disorders. *Annual Review of Psychology*, 67, 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122414-033408>.Gene
- Smoller, J. W. (2016). The Genetics of Stress-Related Disorders: PTSD, Depression, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 297–319. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.266>
- Stein, D. J., & Hollander, E. (2010). *Tratado de los trastornos de ansiedad*. <https://www.casadellibro.com/libro-tratado-de-los-trastornos-de-ansiedad/9788497060691/956599>



The Jackson Laboratory. (2005). *Cepas de ratones endogámicos*.

Tottenham, N. (2012). Human Amygdala Development in the Absence of Species-Expected Caregiving. *Developmental Psychobiology*, 54(6), 598–611. <https://doi.org/10.1002/dev.20531>.Human

Vivero, M. (2010). *Terapia cognitiva aplicada a fobias específicas basada en la perspectiva de Aaron Beck para trastornos de ansiedad*. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/4153>

Walker, C., Bath, K. G., Joels, M., Korosi, A., Lucassen, P. J., Morris, M. J., Rainekei, C., Roth, T. L., Sullivan, R. M., Taché, Y., & Baram, T. Z. (2018). *Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents. critical considerations of methodology, outcomes and translational potential*. 20(5), 421–448. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1343296>.Chronic

Wearick-Silva, L. E., Orso, R., Martins, L. A., Creutzberg, K. C., Centeno-Silva, A., Xavier, L. L., Grassi-Oliveira, R., & Mestriner, R. G. (2019). Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and Bdnf/TrkB and Drd1/Drd2 gene expression in different mouse brain regions. *Behavioural Brain Research*, 359, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.025>

Weinstock, M. (2009). Contribution of Early Life Stress to Anxiety Disorder. *Stress - From Molecules to Behavior: A Comprehensive Analysis of the Neurobiology of Stress Responses*, 189–205. <https://doi.org/10.1002/9783527628346.CH10>

Wieland, I., Comijs, H. C., Stek, M. L., & Rhebergen, D. (2017). Childhood Abuse and the Two-Year Course of Late-Life Depression. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 25(6), 633–643. <https://doi.org/10.1016/J.JAGP.2017.01.014>



Yan, H. C., Cao, X., Das, M., Zhu, X. H., & Gao, T. M. (2010). Behavioral animal models of depression. *Neuroscience Bulletin*, 26(4), 327–337.  
<https://doi.org/10.1007/S12264-010-0323-7>

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015a). *The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior*. March, 1–7.  
<https://doi.org/10.3791/52587>

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015b). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2015(97). <https://doi.org/10.3791/52587>



*Instrumento de recolección de datos*

**Test de Campo Abierto**

Tabla de Registro Test de Campo Abierto										
Jaula	ID	Cepa	Sexo	Latencia para salir de área central (s)	Tiempo permanencia en área central (s)	Número de cruzamientos	Número de entradas área central	Número de rearings	Número de groomings	Nº bolos fecales



**Test de Laberinto Elevado en Cruz**

Tabla de registro Test de Laberinto elevado en cruz													
Jaula	ID	Cepa	Sexo	Grupo	Latencia 1era entrada brazos oscuros	Número de entradas brazo abierto	T. Brazos abiertos (sec)	Total, tiempo brazos abiertos (sec)	Nº entradas brazos cerrados	Nº Transiciones	Tiempo total permanecen brazos cerrados	% T. brazos cerrados	Nº bolos fecales





*Test de Nado Forzado*

Tabla de registro Test de Nado forzado							
Jaula	ID	Cepa	Sexo	Grupo	Tiempo de latencia para 1era inmovilidad (s)	Tiempo total de inmovilidad (últimos 4min).	N° de bolos fecales



*Anexos:*

**Presupuesto**

<b>Ítems</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio unitario</b>	<b>Precio total</b>
Ratones C57BL/6NCrI	120	S/ 21	S/ 2520
Ratones BALB/c	120	S/ 21	S/ 2520
Alimento	80 kg	S/ 7 / 1 Kg	S/ 560
Alojamiento mensual de ratones (5 por jaula)	48	S/ 361	S/ 17328
Guantes de nitrilo paquetes x 50	4	S/ 0.30	S/ 120
Papel toalla x 50	40	S/ 3	S/ 120
Alcohol 70% (frasco 1000 ML)	24	S/ 9.50	S/ 228
Marcador permanente	20	S/ 3	S/ 60
Hojas Bond x millar	2	S/ 12	S/ 24
Lápiz y lapiceros (cada x 12)	4	S/ 10	40
Plumón de pizarra de varios colores	30	S/ 3	S/ 90
Cintas adhesivas de 2M	3.50	S/ 10	S/ 35
Botas de cirugía x60	6	S/ 15	S/ 90
Cofias x100	2	S/ 15	S/ 30
Mandiles desechables	50	S/ 5	S/ 250
<b>Total:</b>			<b>S/ 23985</b>



**Matriz de Consistencia**

Impacto de la adversidad en la infancia en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en ratones adolescentes y adultos C57BL/6Ncr1

y BALB/c, Cusco 2021.

Formulación de Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
<p><b>General:</b></p> <p>¿De qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2021?</p> <p><b>Específicos:</b></p> <p>¿En qué medida el impacto de la adversidad en la infancia influye sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso de acuerdo con el genotipo?</p> <p>¿En qué manera el impacto de la adversidad en la</p>	<p><b>General:</b></p> <p>Determinar de qué manera la adversidad en la infancia afecta los comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones adolescentes y adultos de dos cepas endogámicas, Cusco 2021.</p> <p><b>Específicos:</b></p> <p>Analizar en qué medida el impacto de la adversidad en la infancia influye sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso de acuerdo con el genotipo.</p>	<p><b>Hg1:</b> Si se expone a dos cepas de ratones al protocolo RMN durante el DPN 2-9, entonces se inducirá alteraciones en la forma de sus comportamientos de tipo ansiosos y depresivos, donde los ratones de la cepa BALB/c se verán más afectados en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6Ncr1, puesto que los ratones de la primera cepa tienden a comportamientos de tipo reactivo mayores frente a estresores.</p>	<p><b>Independientes:</b></p> <p>Vi: Adversidad en la vida temprana.</p> <p><b>Dependientes:</b></p> <p>Vd1: Respuestas comportamentales tipo depresivas.</p> <p>Vd2: Respuestas comportamentales tipo ansiosas.</p> <p><b>Control</b></p> <p>Vc1: Cepa.</p> <p>Vc2: Sexo.</p>	<p><b>Alcance de Investigación:</b> Explicativo</p> <p><b>Diseño de Investigación:</b> Diseño experimental puro de tipo factorial</p> <p><b>Sujetos:</b> 240 ratones de las cepas C57BL/6Ncr1 y BALB/c (120 machos y 120 hembras).</p> <p><b>Metodología:</b> Paradigma de escasez/adversidad en la vida temprana: Restricción de material de cama y nido.</p> <p><b>Recolección de datos:</b></p>



<p>infancia repercute en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso según el período del desarrollo?</p> <p>¿En qué medida el impacto de la adversidad en la infancia incide sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso conforme al sexo?</p>	<p>Explicar en qué manera el impacto de la adversidad en la infancia repercute en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso según el período del desarrollo.</p> <p>Comparar en qué medida el impacto de la adversidad en la infancia incide sobre los comportamientos de tipo depresivo y ansioso conforme al sexo.</p>	<p><b>Hg2:</b> La exposición a la adversidad en la vida temprana repercutirá de manera diferente en los comportamientos de tipo depresivo y ansioso en machos y hembras independiente de la cepa, siendo las ratonas hembra las más afectadas.</p> <p><b>Hg3:</b> El impacto de la adversidad en la vida temprana en forma de cuidados maternos fragmentados en las respuestas comportamentales de tipo ansioso y depresivo presentadas en el periodo del desarrollo de la adolescencia se mantendrán en el periodo del desarrollo de la adultez.</p>		<ul style="list-style-type: none"><li>- Prueba de laberinto de campo abierto (CA).</li><li>- Prueba en el laberinto elevado en cruz (LEC).</li><li>- Prueba de la natación forzada (NF).</li></ul> <p><b>Análisis estadístico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- GraphPad Prism 6.01</li><li>- ANOVA de 2 factores</li></ul>
---	--	---	--	--